(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 835 707**

(51) Int. CI.:

A61K 35/76 (2015.01)
A61K 47/69 (2007.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 17/10 (2006.01)
A61P 31/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2015 PCT/EP2015/052635**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2015 WO15118150**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2015 E 15703086 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2020 EP 3102218**

(54) Título: **Tratamiento de infecciones bacterianas tópicas y sistémicas**

(30) Prioridad:

07.02.2014 GB 201402139

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.06.2021

(73) Titular/es:

FIXED PHAGE LIMITED (100.0%)
Barwell, Sterling House, 20 Renfield Street
Glasgow G2 5AP, GB

(72) Inventor/es:

MATTEY, MICHAEL y
BELL, EMMA LISA

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de infecciones bacterianas tópicas y sistémicas

[0001] La presente invención se refiere a composiciones y métodos para el tratamiento de infecciones bacterianas en mamíferos, especialmente en seres humanos. En particular, la presente invención se refiere al tratamiento de infecciones bacterianas tópicas.

[0002] En los últimos años, como la resistencia a los antibióticos convencionales ha seguido creciendo y la aplicación de productos químicos biocidas se vuelve cada vez más inaceptable por motivos ambientales, la atención se ha métodos alternativos para el control de la infección bacteriana.

[0003] Un enfoque prometedor implica la aplicación de bacteriófagos, siendo virus ubicuos de origen natural que son inofensivos para los seres humanos, los animales, las plantas y los peces, pero letales para las bacterias. Los bacteriófagos son específicos e infectarán solo determinados tipos de bacterias, con varios productos sanitarios ahora en el mercado contra patógenos como *Salmonella* y *Listeria.*

[0004] Los bacteriófagos tienen acciones específicas contra una variedad de cepas de una única especie huésped, ocasionalmente más de una especie huésped (por ejemplo, *Escherichia* y *Klebsiella*). Esto hace que los bacteriófagos sean menos útiles como antibióticos generales, pero más útiles para intervenciones dirigidas. Los antibióticos tienen una especificidad más amplia y, por lo tanto, son útiles para intervenciones y uso de emergencia, pero sufren la aparición de cepas resistentes con el uso.

[0005] Infecciones tópicas tales como acné y el impétigo pueden ser tratables con bacteriófago como una alternativa a productos existentes que se consideran ineficientes: se han propuesto algunos lavados de manos de hospital que contienen bacteriófago K pero no han sido ampliamente perseguidos; se conocen muchos tratamientos para el acné, pero la mayoría incluyen agentes activos como el ácido salicílico y el peróxido de benzoilo que se sabe que dañan la piel.

[0006] US 2007-014770 da a conocer un bacteriófago capaz de lisar una bacteria anti-acné y una composición farmacéutica que comprende tal bacteriófago. El documento US 2003-180319 describe composiciones farmacéuticas que comprenden un panel de bacteriófagos, opcionalmente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los bacteriófagos se describen como adecuados para ser incorporados en consumibles tales como jabón, cremas de manos o faciales, cremas y espumas de afeitar, hilo dental, polvos dentales, pasta de dientes, etc. EP 0414304 describe una composición bactericida en forma de crema o loción, que comprende un aceite, un emulsionante, agua y un bacteriófago capaz de lisar *Propionibacterium acnes,* que se sabe que causa acné. El documento EP 1504088 describe el tratamiento tópico de infecciones bacterianas usando composiciones que contienen bacteriófagos, incluido el tratamiento del acné y las heridas infectadas. En particular, el documento EP 1504088 describe la aplicación tópica de una solución de fagos en las fosas nasales usando botones de algodón, pero no otras formulaciones. Otros supuestos tratamientos que utilizan composiciones similares incluyen: reducción del olor corporal dirigiéndose a las bacterias de la piel que producen olor; y tratamiento de caries dentales o enfermedad de las encías dirigiéndose a *Streptococcus mutans, Bacteriodes gingivalis* y/o *Haemophilus actinomycetemcomitans.*

[0007] Un problema general con la terapia de bacteriófagos, por ejemplo, en la minireview "Terapia de bacteriófagos" identificada por Sulakvelidze et al, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, marzo de 2001, pp 649 a 659 es la ausencia de demostración de la eficacia de tales preparaciones. De hecho, en la técnica anterior mencionada anteriormente no se proporcionan formulaciones de trabajo o pruebas de principio.

[0008] Bruttin y Brüssow (Antimicrob Agent Chemother julio de 2005; 49 (7), pp2874-2878) informó sobre una prueba de seguridad de la terapia de fagos de la diarrea, concluyendo que la aplicación del fago oral no causa una disminución en recuentos totales de materia fecal de *E. coli*, es decir, no curó la diarrea.

[0009] Otros problemas identificados por Sulakvelidze et al incluyen el riesgo de que la rápida eliminación de los fagos del cuerpo humano reducirá o eliminará los efectos posibles, la producción de anticuerpos anti-fago en el paciente, la mala estabilidad de fago en el cuerpo, el intervalo huesped estrecho de fagos y pureza insuficiente de las preparaciones de fagos. Kucharewicz-Krukowska y Slopek (Arch Immunol Ther Exp (Varsovia) 1987; 35 (5) pp553-561) documentaron la producción de anticuerpos después de la administración de bacteriófagos libres, detectando tanto anticuerpos neutralizantes como hemaglutinantes. Otra revisión, de Skurnik y Strauch (International Journal of Medical Microbiology 296 (2006) pp5-14) señaló que la susceptibilidad *in vivo* de los patógenos bacterianos a los bacteriófagos todavía se conoce poco. Por último, Capparelli et al (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, agosto de 2007, pp2765-2773) describe una terapia de fagos contra *S. aureus,* utilizando una dosis de fago de 10^9 UFP, por lo que se requiere una cantidad de fago excepcionalmente alta y desagradable para lograr la terapia en ratones.

[0010] Los documentos WO 03/093462 (Universidad de Strathclyde) y WO 2012/175749 (Fagos fijos) describen partículas con bacteriófagos unidos covalentemente a las mismas para el tratamiento de una infección bacteriana. El documento WO 03/093462 describe la ingestión de una preparación que contiene bacteriófagos inmovilizados

covalentemente en cuentas de 10 mm para el tratamiento de la intoxicación alimentaria. No revela el uso de cuentas de ningún otro tamaño. El documento WO 2012/175749 describe la aplicación de una preparación que contiene bacteriófagos inmovilizados sobre partículas para el tratamiento de heridas profundas infectadas e infección bacteriana de plantas.

[0011] Ni el documento WO 2012/175749 ni WO 2012/175749 dan a conocer la aplicación de las preparaciones que comprenden partículas que llevan bacteriófago inmovilizado covalentemente a la piel o la superficie externa de un paciente humano o animal.

[0012] El documento WO 2007/072049 (Blaze Venture Technologies) describe métodos para estabilizar bacteriófagos mediante covalencia uniéndolos a partículas de 10 mm de diámetro mediante la activación de las partículas con una descarga eléctrica.

[0013] El documento US 2002/001590 (Kelly) describe un bacteriófago capaz de lisar Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (MRSA) y composiciones farmacéuticas que comprenden dicho bacteriófago.

[0014] Brüggemann y Lood, "Bacteriophages Infecting Propionibacterium acnes" BioMed Research International Volumen 2013, artículo ID 705741, 10 páginas, describe un bacteriófago capaz de lisar *Propionibacterium acnes.* Brüggemann y Lood también reconoce que ninguna terapia de bacteriófagos exitosa contra enfermedades asociadas con *P. acnes* todavía no se había proporcionado y nota que estudios adicionales pueden eventualmente permitir la investigación de la posibilidad de utilizar fagos, o moléculas derivadas de fagos, como una terapia contra enfermedades asociadas con *P. acnes*.

[0015] Gilmer, et al., "Novel Bacteriophage Lysin with Broad Lytic Activity Protects against Mixed Infection by Streptococcus pyogenes and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus" Antimicrobial Agents and Chemotherapy, junio de 2013, Volumen 57, Número 6, pp. 2743-2750, describe "una lisina del bacteriófago (PlySs2), derivado de un *Streptococcus suis* bacteriófago, con actividad lítica contra el MRSA, vancomicina-intermedio *S. aureus* (VISA), *Streptococcus suis, Listeria, Staphylococcus simulans, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus equi, Streptococcus agalactiae* (grupo B estreptococo [GBS]), *S. pyogenes, Streptococcus sanguis,* grupo G de estreptococos (GGS), grupo e estreptococos (GES), y *Streptococcus pneumoniae.*

[0016] Mattey y Spencer, "Bacteriophage therapy - cooked goose or Phoenix rising?" Current Opinion in Biotechnology 2008, 19:. 608-612, es un artículo de revisión que tenga en cuenta los tratamientos de bacteriófagos externos de las heridas, el intestino y los oídos

[0017] Un objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones que sean activas en el tratamiento de:

(1) acné;
(2) impétigo, por ejemplo causado por *S. aureus* y/o *S. pyogenes;*
(3) foliculitis, furunculosis o carbunculosis, por ejemplo causado por *S. aureus* o *Pseudomonas aeruginosa;*
(4) ectima, por ejemplo causada por *S. aureus* o *S. pyogenes;* o
(5) la erisipela o celulitis, por ejemplo, causadas por el grupo A β-hemolíticos Streptococcus (erisipela), *S. aureus* (celulitis) o *S. pyogenes.*

[0018] También se describen en este documento son composiciones que son sistémicamente activo en el tratamiento de infecciones bacterianas y el tratamiento de tales infecciones en humanos.

[0019] Por consiguiente, la presente invención proporciona bacteriófagos unidos covalentemente a una partícula portadora, para uso en el tratamiento tópico de

(1) acné;
(2) impétigo, por ejemplo causado por *S. aureus* y/o *S. pyogenes;*
(3) foliculitis, furunculosis o carbunculosis, por ejemplo causado por *S. aureus* o *Pseudomonas aeruginosa;*
(4) ectima, por ejemplo causada por *S. aureus* o *S. pyogenes;* o
(5) erisipela o celulitis, por ejemplo, causadas por el grupo A estreptococo β-hemolítico (erisipela), *S. aureus* (celulitis) o *S. pyogenes.*

[0020] Las formulaciones tópicas, que comprenden un bacteriófago unido covalentemente a una partícula de soporte y un vehículo farmacéuticamente o excipiente aceptable, también se proporcionan para el tratamiento de la infección bacteriana, como lo son los métodos de tratamiento de tales infecciones.

[0021] También se describe en la presente memoria bacteriófago unido covalentemente a una partícula de soporte de diámetro medio de 7 micras o menos, para su uso en el tratamiento sistémico de la infección bacteriana y composiciones para la administración sistémica a un mamífero para tratar una infección bacteriana, que comprende el bacteriófago covalentemente unido a la partícula portadora.

[0022] Las composiciones de la invención también pueden contener un antibiótico, en el que el bacteriófago es lítico para las bacterias contra las que el antibiótico es eficaz.

[0023] En todas las realizaciones, la invención proporciona nuevas terapias antibacterianas, métodos y usos.

[0024] La invención por lo tanto proporciona bacteriófago unido covalentemente a una partícula de soporte, para su uso en el tratamiento tópico de:

(1) acné;
(2) impétigo, por ejemplo causado por *S. aureus* y/o *S. pyogenes;*
(3) foliculitis, furunculosis o carbunculosis, por ejemplo causadas por *S. aureus* o *Pseudomonas aeruginosa;*
(4) ectima, por ejemplo causada por *S. aureus* o *S. pyogenes;* o
(5) erisipela o celulitis, por ejemplo, causadas por el grupo A estreptococo β-hemolítico (erisipela), *S. aureus* (celulitis) o *S. pyogenes.*

[0025] En un ejemplo a continuación, una formulación de bacteriófago de este tipo mostró estabilidad y actividad mejoradas de forma significativa retenida en el tiempo en comparación con formulaciones de control.

[0026] Zonas preferidas del cuerpo para la terapia tópica utilizando composiciones de la invención incluyen la piel, los dientes, los ojos, nariz y orejas.

[0027] La partícula portadora es típicamente aproximadamente esférica. Puede tener un diámetro medio de hasta 20 micras, hasta 15 micras, hasta 10 micras, de 0,1 micras, de 0,5 micras o cualquier combinación de estos, por ejemplo, de 0,1 micras a 20 micras o de 0,5 micras a 10 micras. Las partículas en general pueden ser aproximadamente redondas o esferoides; preferiblemente son suaves, especialmente para su uso en partes sensibles del cuerpo. En las realizaciones, el bacteriófago se utiliza en el tratamiento de una infección bacteriana de la piel.

[0028] El tamaño de partícula de hasta 20 micras da una formulación de sensación más suave (véase, por ejemplo, las cremas descritas en más detalle a continuación), por lo que los tamaños en el rango de 1 - 20 micras, 10-15 micras, hasta 10 micras y 1 - 10 micras son todos adecuados. Los tamaños de alrededor de 3 micras dan una sensación particularmente cremosa a la formulación.

[0029] El tamaño de partícula se mide adecuadamente usando métodos y aparatos reconocidos como estándar en la técnica. El tamaño de las partículas en las dispersiones se puede lograr utilizando una variedad de técnicas, que incluyen difracción láser, dispersión dinámica de luz (DLS), centrifugación de disco y microscopía óptica. Todas estas técnicas tienen sus ventajas y limitaciones. La difracción láser se basa en una presentación bien controlada de la muestra en la región de medición y se limita a muestras con un rango estrecho de concentraciones de partículas. A menudo se requiere dilución y esto puede afectar el tamaño de las partículas, particularmente en compuestos con alta solubilidad. Malvern Instruments (Reino Unido) fabrica ejemplos de equipos de dimensionamiento, utilizando métodos de difracción láser.

[0030] En realizaciones preferidas adicionales de la invención, se proporcionan bacteriófagos unidos covalentemente a una pluralidad de partículas. Estas están preferiblemente en una forma relativamente homogénea, en la que una gran proporción, preferiblemente sustancialmente todas, de la pluralidad de partículas tienen diámetros en el rango indicado, más preferiblemente 80% o más, 90% o más o 95% o más de las partículas con los fagos unidos covalentemente tienen diámetros en el rango indicado (siendo cualquier rango como se indica anteriormente o en cualquier otro lugar de este documento).

[0031] Las partículas para uso en la invención a las que se inmovilizan bacteriófagos mediante enlace covalente son generalmente sustancialmente inertes para el animal que se va a tratar. En los ejemplos, se utilizaron partículas de nylon (cuentas). Puede usarse otro material biocompatible inerte, preferiblemente no tóxico. Además, la partícula puede estar hecha de un material biodegradable. Los materiales adecuados incluyen polimetilmetacrilato, polietileno, copolímero de etileno/acrilato, nylon-12, poliuretano, resina de silicona, sílice y nylon 1010. WO 2003/093462 describe materiales adicionales de los que se pueden fabricar las partículas.

[0032] La inmovilización o unión del bacteriófago al sustrato de partículas se puede lograr de varias formas. Preferiblemente, los bacteriófagos se inmovilizan mediante enlaces covalentes formados entre la proteína de la cubierta del bacteriófago y el sustrato portador.

[0033] Además, el bacteriófago se inmoviliza preferiblemente al sustrato a través de sus grupos de cabeza o nucleocápside por activación de la partícula de sustrato antes de la adición y unión de bacteriófago.

[0034] El término "activado/activador/activación" se entiende que significa la activación del sustrato tal como eléctricamente, por ejemplo mediante descarga en corona, o por reacción de dicho sustrato con diversos grupos químicos (dejando una química superficial capaz unirse a los virus, tales como cabeza de bacteriófago o grupos de cápside).

[0035] La activación de dicho sustrato se puede lograr, por ejemplo, mediante hidrólisis preliminar con un ácido, preferiblemente HCl seguido de una etapa de lavado con agua y un álcali para neutralizar el ácido. Preferiblemente, dicho álcali es bicarbonato de sodio. La unión de bacteriófagos a través de sus grupos de cabezas es ventajosa. En el caso de bacteriófagos complejos, por ejemplo, la unión a través de grupos de cabeza deja los grupos de cola, que son necesarios para el reconocimiento específico de bacterias, libres para infectar, es decir, unirse y penetrar en una célula bacteriana huésped. Una pluralidad de diversos bacteriófagos específicos de cepas se pueden inmovilizar en un sustrato en cualquier momento.

[0036] El acoplamiento de fagos a un sustrato es el resultado de la formación de enlaces covalentes entre la proteína de la cubierta viral y el sustrato, por ejemplo, a través de un grupo amino en un péptido, por ejemplo, un enlace peptídico. Los "agentes de acoplamiento" que ayudan a este proceso varían y dependen del sustrato utilizado. Por ejemplo, para el acoplamiento al sustrato de nylon u otro polímero con grupos de superficie amino o carboxi, se pueden usar los agentes de acoplamiento carbodiimida o glutaraldehído.

[0037] Otros detalles de los métodos y métodos preferidos para la unión covalente de bacteriófago a las partículas, reteniendo la infectividad del fago, se describen en más detalle en el documento WO 2003/093462 y WO 2007/072049.

[0038] La invención se usa para preparar tratamientos tópicos que se aplicarán externamente, por ejemplo, a la piel, dientes, ojos, nariz y oídos de un paciente. En particular, la invención puede usarse para el tratamiento del acné. Un problema con las preparaciones conocidas es la presencia de productos químicos que dañan la piel. En realizaciones particulares de la invención, el bacteriófago se formula sin ácido salicílico y sin peróxido de benzoílo.

[0039] La invención también se puede utilizar para el tratamiento de (1) el impétigo, por ejemplo causado por *S. aureus* y/o *S. pyogenes;* (2) la foliculitis, furunculosis o carbunculosis, por ejemplo causadas por *S. aureus* o *Pseudomonas aeruginosa;* (3) ectima, por ejemplo causada por *S. aureus* o *S. pyogenes;* o (4) la erisipela o celulitis, por ejemplo, causadas por el grupo A estreptococo β-hemolítico (erisipela), *S. aureus* (celulitis) o *S. pyogenes.*

[0040] La invención también se puede utilizar para el tratamiento de las bacterias responsables de los olores corporales, tales como en una formulación desodorante o en una formulación antitranspirante que también tiene propiedades desodorantes.

[0041] Se prefiere que múltiples tipos de bacteriófagos se utilizan al mismo tiempo. Esto da actividad contra más bacterias diana y reduce el desarrollo de resistencia. Por lo tanto, las realizaciones de la invención comprenden una pluralidad de bacteriófagos activos contra 3 o más cepas de bacterias, unidos covalentemente a partículas portadoras, o bacteriófagos activos contra 5 o más cepas de bacterias, unidas covalentemente a las partículas portadoras para su uso como se describe. Preferiblemente los bacteriófagos son todos activos contra diferentes cepas de la misma especie bacteriana, por ejemplo los bacteriófagos son líticos para diferentes cepas de *S. aureus* o líticos para diferentes cepas de *P. acnes.*

[0042] La invención proporciona correspondientemente una formulación tópica, que comprende un bacteriófago unido covalentemente a una partícula de soporte tal como se define en el presente documento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de:

(1) acné;
(2) impétigo, por ejemplo causado por *S. aureus* y/o *S. pyogenes;*
(3) foliculitis, furunculosis o carbunculosis, por ejemplo causadas por *S. aureus* o *Pseudomonas aeruginosa;*
(4) ectima, por ejemplo causada por *S. aureus* o *S. pyogenes;* o
(5) erisipela o celulitis, por ejemplo, causadas por el grupo A estreptococo β-hemolítico (erisipela), *S. aureus* (celulitis) o *S. pyogenes.*

[0043] La invención proporciona correspondientemente una formulación tópica, que comprende un bacteriófago unido covalentemente a una partícula de soporte tal como se define en el presente documento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento del acné.

[0044] La invención proporciona correspondientemente una formulación tópica, que comprende un bacteriófago unido covalentemente a una partícula de soporte tal como se define en el presente documento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento del olor corporal.

[0045] La formulación tópica no es preferiblemente simplemente bacteriófago en partículas en suspensión en agua y preferiblemente comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable distinto de (opcionalmente además) de agua. La formulación puede estar en forma de gel, crema o loción, comprendiendo adecuadamente uno o más o todos de un agente formador de gel, un agente formador de crema, una cera, un aceite, un tensioactivo y un aglutinante. Para uso tópico, especialmente en la piel, el uso de uno o más de estos componentes puede ayudar a aumentar el tiempo de retención en la piel y aumentar la eficacia de la preparación.

[0046] Las formulaciones como gel o cremas son particularmente preferidas. En una realización específica de la invención, descrita con más detalle a continuación, se prepara una crema que comprende bacteriófago unido covalentemente a partículas de nylon en una crema acuosa que contiene lanolina anhidra, parafina blanda blanca BP y parafina líquida ligera PhEur. En general, todas las cremas y geles adecuados para aplicación tópica en la piel, en particular en la piel humana, son adecuados como base para la formulación de bacteriófagos según la invención.

[0047] La producción de una crema o loción en general requiere el aporte de calor para mezclar y emulsionar la composición. La aplicación de calor es una forma útil de reducir cualquier carga bacteriana contaminante en tal composición estándar. Los bacteriófagos nativos son susceptibles a temperaturas elevadas y se vuelven inactivos con el calentamiento y, por tanto, no son adecuados para su inclusión durante la producción de tales preparaciones. Sin embargo, sorprendentemente, los bacteriófagos unidos covalentemente a un soporte sólido son significativamente más estables al calor que los bacteriófagos nativos. En consecuencia, se puede incluir bacteriófago inmovilizado covalentemente en preparaciones tratadas térmicamente, por ejemplo, esterilizadas térmicamente. Esto es particularmente ventajoso porque los métodos de esterilización basados en radiación o químicos dañan los ácidos nucleicos y, por tanto, no son adecuados para el tratamiento de una composición que contiene bacteriófagos. El material genético del bacteriófago debe permanecer intacto para que el bacteriófago sea infeccioso.

[0048] Las realizaciones particulares de la invención proporcionan una crema o gel que comprende bacteriófagos líticos para *P. acnes* unidos covalentemente a partículas portadoras de un diámetro medio de hasta 20 micras. Los bacteriófagos pueden ser líticos durante al menos 3 o al menos 5 o más diferentes cepas de *P. acnes* unidas covalentemente a las partículas portadoras. Son especialmente adecuados para el tratamiento del acné o del olor corporal (causado por bacterias).

[0049] Otras formas de realización particulares de la invención proporcionan una crema o gel que comprende bacteriófagos líticos para *S. aureus* unido covalentemente a partículas portadoras de un diámetro medio de hasta 20 micras. Los bacteriófagos pueden ser líticos durante al menos 3 o al menos 5 o más diferentes cepas de *S. aureus* unidas covalentemente a las partículas portadoras. Estas son especialmente adecuadas para el tratamiento de infecciones de la piel causadas por *S. aureus.*

[0050] En uso, se encuentra que el fago inmovilizado sobre partículas, por ejemplo cuentas son más estables que el fago libre. Además, se encuentra que las cuentas se unen a la piel, mejorando la localización y es menos probable que se laven o cepillen o se caigan después de secar la formulación, mejorando nuevamente la eficacia de la terapia.

[0051] La invención proporciona aún más métodos para tratar tópicamente:

(1) acné;
(2) impétigo, por ejemplo causado por *S. aureus* y/o *S. pyogenes;*
(3) la foliculitis, furunculosis o carbunculosis, por ejemplo causadas por *S. aureus* o *Pseudomonas aeruginosa;*
(4) ectima, por ejemplo causada por *S. aureus* o *S. pyogenes;* o
(5) la erisipela o celulitis, por ejemplo, causadas por el grupo A estreptococo β-hemolítico (erisipela), *S. aureus* (celulitis) o *S. pyogenes,*

que comprende administrar un bacteriófago unido covalentemente a una partícula portadora o una formulación de la misma como se definió anteriormente.

[0052] También se describe en la presente memoria un bacteriófago unido covalentemente a una partícula de soporte de diámetro medio de 7 micras o menos, para su uso en el tratamiento sistémico de la infección bacteriana.

[0053] Como se describe en detalle a continuación, se utilizaron los bacteriófagos inmovilizados sobre tales partículas para tratar una infección sistémica *S. aureus.* Los resultados mostraron que estas partículas administradas sistémicamente con bacteriófagos unidos covalentemente eran seguras y eficaces en el tratamiento de la infección.

[0054] Por tanto, tales bacteriófagos en partículas están adaptados para uso sistémico, ya que las partículas portadoras tienen un tamaño elegido o por debajo de él para permitir la circulación dentro de los vasos sanguíneos del paciente, en particular dentro de un paciente humano. De manera similar, las partículas portadoras tienen un tamaño adecuado o superior a un tamaño elegido para prevenir la fagocitosis de las partículas durante la circulación dentro del cuerpo del paciente, en particular dentro de un paciente humano. La partícula portadora puede ser aproximadamente esférica y puede tener por separado un diámetro promedio de 6 micras o menos, 5 micras o menos, o 0.1 micras o más, 0,5 micras o más, 1 micra o más, o de 0,diana micras a 6 micras, o de 1 micra a 5 micras.

[0055] En cuanto a los usos tópicos y formulaciones descritas en el presente documento, se prefiere que múltiples tipos de bacteriófagos se utilizan al mismo tiempo. Esto da actividad contra más bacterias objetivo y reduce el desarrollo de resistencia. Por tanto, las realizaciones de la invención de tratamiento sistémico comprenden una pluralidad de bacteriófagos activos contra 3 o más cepas de bacterias, unidos covalentemente a partículas portadoras, o bacteriófagos activos contra 5 o más cepas de bacterias, unidos covalentemente a las partículas portadoras. Preferiblemente, los bacteriófagos son todos activos contra diferentes cepas de la misma especie bacteriana, por

ejemplo los bacteriófagos son líticos para estafilococos o para diferentes cepas de *S. aureus* u otras bacterias que infectan sistémicamente.

[0056] En otros ejemplos, una composición de bacteriófago se utiliza en una terapia de combinación con antibióticos. Por tanto, se proporciona bacteriófago lítico para una bacteria unida covalentemente a una partícula portadora de un diámetro medio de 7 micras o menos en combinación con un antibiótico eficaz contra la misma bacteria para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana sistémica. Por tanto, en un ejemplo específico que se expone a continuación con más detalle, una composición que comprende tanto antibiótico en una dosis terapéuticamente eficaz como bacteriófago unido covalentemente a partículas portadoras fue eficaz para matar bacterias sistémicamente, en la sangre y en órganos de todo el cuerpo. La combinación no confirmó ninguna interacción adversa entre los componentes respectivos.

[0057] La combinación es preferiblemente para la administración sistémica a un mamífero, especialmente seres humanos. Una formulación adecuada, como se usa en los ejemplos siguientes, es una formulación para inyección intravenosa o parenteral.

[0058] En la terapia de combinación, las partículas de soporte son adecuadamente aproximadamente esféricas y dimensionadas adecuadamente como se describe anteriormente, así por ejemplo, tienen un diámetro medio de 6 micras o menos, o de 0,1 micras a 6 micras, o 5 micras o menos, o de 1 micra a 5 micras. La combinación puede usar una pluralidad de bacteriófagos activos contra 3 o más o 5 o más cepas de bacterias, unidas covalentemente a partículas portadoras. Los bacteriófagos pueden ser líticos para estafilococos, especialmente para *S. aureus.*

[0059] En la terapia de combinación, el antibiótico se administra convenientemente en o por encima de su concentración mínima inhibitoria (CMI). En uso, el bacteriófago presente es lítico y mata las bacterias resistentes al antibiótico, lo que mejora la eficacia de la terapia. En un ejemplo específico, que se describe con más detalle a continuación, se administró antibiótico a bacterias que se sabe que han desarrollado resistencia a los antibióticos y, por lo tanto, el antibiótico se administró por debajo de la CIM, que se habría esperado que no fuera eficaz contra todas las bacterias. El antibiótico se administró en combinación con fagos, lo que dio como resultado la muerte bacteriana completa, demostrando así la eficacia de la combinación contra bacterias resistentes.

[0060] Por tanto, las composiciones de la realización de combinación de la invención comprenden el bacteriófago en partículas y además comprenden un antibiótico, en donde el bacteriófago es lítico para las bacterias contra las que el antibiótico es eficaz.

[0061] Los métodos de la terapia de combinación, para el tratamiento sistémico de una infección bacteriana, comprenden la administración de un antibiótico en combinación con un bacteriófago unido covalentemente a una partícula portadora de un diámetro medio de 7 micras o menos. Las características opcionales y preferidas de los métodos son las que se describen en otra parte de este documento en relación con la terapia sistémica con bacteriófagos.

[0062] La invención es adecuada para su uso con bacteriófago en general, sin limitación de la cepa de bacteriófago, aunque preferiblemente con bacteriófago lítico.

[0063] Las formulaciones de la invención comprenden una dosis terapéuticamente eficaz de bacteriófago contra las bacterias diana. El contenido de bacteriófagos será típicamente de 102-1010 UFP, por lo tanto para composiciones de tipo líquido/gel 102-1010 UFP por ml, adecuadamente 103 UFP por ml o más y también por separado adecuadamente hasta 109 o hasta 108 UFP por ml.

[0064] Las formulaciones preferidas para los tratamientos tópicos descritos en este documento comprenden una base estándar y bacteriófago inmovilizado en cuentas como el ingrediente activo. Tales preparaciones para uso tópico son consistentes con las descritas en documentos publicados anteriormente, incluidos los documentos US 2003-180319 y EP 0414304, a los que se hace referencia anteriormente.

[0065] En las formulaciones o composiciones para uso tópico en particular, la dosis puede estar en niveles bajos. La dosis es opcionalmente de 102-106 UFP por ml. En uso, este nivel de fagos puede alcanzar, en la aplicación a la piel, al menos aproximadamente 1 fago por mm^2 de piel, adecuadamente hasta 5, hasta 10 o hasta 100 fagos por mm^2 de piel. Normalmente, cuando hay una infección tópica, la aplicación directa de la formulación significa que una dosis relativamente baja es eficaz; la yuxtaposición del fago inmovilizado y el área infectada aumenta la probabilidad de contacto entre el fago y las bacterias infectantes. También para uso tópico, la carga de fagos de la composición puede diseñarse para administrar un fago por cuenta (así, por ejemplo, 1 fago por cada cuenta de 5 micras) o de 1-5, de 1-10 o 1-100 fagos por cuenta. Por lo tanto, las composiciones pueden diseñarse para que comprendan de 10^2 a 10^6 partículas por ml, de 10^2 a 10^5 partículas por ml o de 10^2 a 10^4 partículas por ml. En uso, este nivel de cuentas de fagos puede alcanzar, en la aplicación a la piel, al menos aproximadamente 1 partícula por mm^2 de piel, adecuadamente de 1-10 o de 1-100 partículas por mm^2 de piel.

[0066] La ruta preferida para la administración sistémica de composiciones de bacteriófagos descritas en este

documento es por inyección, especialmente mediante la administración intravenosa de una preparación farmacéutica de bacteriófago unido covalentemente a partículas, por ejemplo microesferas, como ingrediente activo, suspendido en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0067] La administración sistémica por inyección se describe en muchas publicaciones incluyendo US 2002/001590, Sulakvelidze et al. (mencionado anteriormente), Kucharewicz-Krukowska y Slopek (mencionado anteriormente), y Skurnik y Strauch (mencionado anteriormente). Por lo tanto, las composiciones, métodos y usos para el tratamiento sistémico descritos en este documento son consistentes con métodos de tratamiento sistémico que son bien conocidos por el experto.

[0068] Para uso sistémico, generalmente se requieren dosis más altas. Una dosis adecuada de tales formulaciones, por ejemplo, para uso humano, puede estar en el intervalo de 105-1010 UFP o 107-1010 UFP o 107-109 UFP. La preparación de partículas para estos usos puede diseñarse para administrar un fago por cuenta (por ejemplo, 1 fago por cuenta de 5 micras) o de 1-5, de 1-10 o 1-100 fagos por cuenta.

[0069] Los bacteriófagos para la invención incluyen bacteriófagos en general sin limitación, siempre que el bacteriófago se pueda obtener y su huésped o bacterias diana se puedan cultivar e infectar en cultivo. El bacteriófago puede ser un bacteriófago ssRNA, dsARN, ssADN o dsADN, con disposición circular o lineal del material genético, y que infectan células de bacterias. Los bacteriófagos adecuados incluyen Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae, Lipothrixviridea, Rudiviridae, Ampullaviridae, Bacilloviridae, Bicaudaviridae, Clavaviridae, Corticoviridae, Cystoviridae, Fusseloviridae, Globuloviridae, Guttavirus, Inoviridae, Leviviridae, Plasviridae, Microviridae.

[0070] Los ejemplos de cómo aislar el fago deseado están muy extendidos en la literatura, incluyendo solo a modo de ilustración: Gill JJ y Hyman P, "Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy", Curr Pharm Biotechnol., 2010, Ene; 11 (1): págs. 2-14, y la minireview "Bacteriophage Therapy" mencionada anteriormente por Sulakvelidze et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, marzo de 2001, págs. 649-659.

[0071] Las ventajas de la invención, atribuibles a una o más realizaciones de la misma, incluyen una mayor actividad, especialmente después de un almacenamiento a medio o largo plazo, lo que da como resultado una mayor vida útil del producto. De manera similar, una ventaja de la invención es la mayor resistencia al calor del bacteriófago inmovilizado covalentemente incluido en los productos de la invención. El uso de tal bacteriófago resistente al calor simplifica el proceso de producción y esterilización y, por lo tanto, hace que la composición de tales preparaciones sea más eficiente. Los tratamientos para la piel pueden evitar productos químicos agresivos como el ácido salicílico y el peróxido de benzoilo. El tamaño de las partículas es opcionalmente pequeño y puede proporcionar tratamientos tópicos de sensación suave. Para los tratamientos sistémicos que no son de la invención, el logro de la eficacia sistémica a corto plazo pero también después de muchos días después de la inyección demuestra una retención de la actividad a largo plazo, incluida la actividad almacenada eficazmente *in vivo* en las partículas retenidas internamente. La disminución del aclaramiento del fago en las partículas en comparación con el fago libre prolonga aún más la eficacia de la terapia. La combinación de la especificidad de los bacteriófagos para atacar cepas de bacterias resistentes a los antibióticos con la especificidad más amplia de los antibióticos puede superar los problemas conocidos de resistencia a los antibióticos, tanto en casos individuales de uso como en la distribución ambiental de las bacterias al proporcionar una selección contra mecanismos de resistencia particulares.

[0072] Las respuestas de anticuerpos a los fagos libres se conocen por la técnica anterior. Además, se aprecia en la técnica que el uso de dosis repetidas de bacteriófago libre aumentará la probabilidad de producción de anticuerpos neutralizantes que serán perjudiciales para el uso de bacteriófagos como terapia invasiva eficaz. Según la presente invención, el uso de bacteriófagos inmovilizados covalentemente tiene la sorprendente ventaja de una estimulación ausente o muy baja de una respuesta de anticuerpos. Esto se confirma en ejemplos específicos. Además, la estabilidad a largo plazo de las preparaciones inmovilizadas en comparación con los fagos libres permite la reducción tanto de la dosis por administración como del número o frecuencia de las administraciones, lo que conduce a una reducción adicional de la respuesta inmunitaria, si la hay, a la terapia. El bacteriófago inmovilizado puede no generar una respuesta de anticuerpos debido al hecho de que hay poco o ningún material antigénico en la superficie de, por ejemplo, cuentas o microesferas a las que se une el fago. Esta observación y la ventaja resultante es inesperada y sorprendente. Por tanto, es poco probable que el uso de una dosis humana de, digamos, 10^7 a 10^{10} UFP (compárelo con 10^9 UFP de fago libre utilizado en la técnica anterior de ratón) produzca una respuesta inmune incluso después de dosis repetidas.

[0073] Como se describe en los ejemplos a continuación, también se encontró que el fago inmovilizado sobre partículas se retienen en el cuerpo, en forma activa, durante largos períodos de tiempo, por la retención por ejemplo en el hígado. Las partículas que portan fagos activos (es decir, infecciosos) fueron detectables en el hígado de los animales 14 días después de la inyección sistémica. Esto proporciona un efecto prolongado del tratamiento sistémico, ya que la sangre que circula por el hígado hace que las bacterias entren en contacto con estos fagos activos atrapados. La actividad antibacteriana es, por tanto, de duración inesperada y sorprendentemente larga.

[0074] El fago se puede neutralizar por separado mediante complemento. De nuevo, en pruebas específicas separadas de la invención, hemos demostrado que sorprendentemente el fago inmovilizado no es neutralizado por el

complemento, mientras que el fago libre sí. Este es un beneficio adicional y separado de los usos y terapias descritos en este documento.

[0075] La invención y otras revelaciones en el presente documento ahora se ilustran en formas de realización específicas con referencia a los dibujos que se acompañan, en los que

Fig. 1 muestra la supervivencia de fago en formulaciones que contienen fagos de la invención en almacenamiento;
Fig. 2 muestra el efecto de microesferas de dosis alta tratadas con bacteriófago purificado sobre el aumento de peso;
Fig. 3 muestra el curso temporal de la temperatura de dos animales después de una dosis subcutánea (s.c.) de 100 µl 1 x 10^8 ufc/ml de E15 y una inyección intravenosa (i.v.) en la cola de microesferas tratadas con bacteriófago de 5 mm;
Fig. 4 muestra recuentos bacterianos de 24 horas después de una dosis de 100 µl de 1 x 10^8 ufc/ml de E15 suspendida en HM;
Fig. 5 muestra la evolución de las bacterias y los bacteriófagos en un animal (9676) después de una dosis s.c. de 100 µl 1 x 10^8 ufc/ml de E15 y una inyección i.v. en la cola de microesferas tratadas con bacteriófagos de 5 mm;
Fig. 6 muestra el curso temporal de las bacterias en la sangre total. Los animales de ensayo (cuadrado abierto, triángulo sombreado) se inocularon con 50 µl de 5 x 10^7 ufc/ml E15 suspendido en mucina gástrica de cerdo al 5% por vía intraperitoneal (i.p.) con una inyección secundaria de microesferas tratadas con bacteriófagos por vía intravenosa. El animal de control (diamante sombreado) fue inoculado con 50 µl de 5 x 10^7 ufc/ml E15 suspendido en mucina gástrica de cerdo al 5% i.p. solamente;
Fig. 7 muestra el curso de tiempo después de ufc/sangre total en animales de ensayo inoculados con 50 µl de 5 x 10^7 ufc/ml de E15 suspendido en mucina gástrica de cerdo al 5% i.p. con una inyección secundaria de microesferas i.v. tratadas con bacteriófagos;
Fig. 8 muestra el efecto de ampicilina en *S. aureus* 8588;
Fig. 9 muestra el efecto de fagos K en *S. aureus* 8588;
Fig. 10 muestra el efecto de la concentración de ampicilina inhibidor sobre la matanza fago K de *S. aureus* 8588;
Fig. 11 muestra los resultados de probar una respuesta *in vivo* a la administración de fagos en partículas;
Fig. 12 muestra los efectos del suero normal e inactivado por calor sobre el bacteriófago K libre;
Fig. 13 muestra los efectos del suero normal e inactivado por calor sobre el bacteriófago K inmovilizado;
Fig. 14 muestra las suturas retiradas de la rata después de dos semanas;
Fig. 15 muestra una fotomicrografía de hígado de rata 14 días después de la administración de microesferas como se describe en este documento; y
Fig. 16 muestra los resultados de un ensayo de crema que contiene fagos en piel humana.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Formulaciones de bacteriófagos para el tratamiento del acné

[0076] Los bacteriófagos de *propionibacterium acnes* (FP PA1) se inmovilizaron sobre cuentas de nylon (diámetro medio de 10 micras) y se mezclan en las formulaciones A, B y C como se indica a continuación. A continuación, se ensayó cada formulación para determinar la supervivencia del bacteriófago a temperatura ambiente.

Formulación A - crema acuosa

[0077]

Lanolina anhidra	1,0% p/p
Parafina blanda blanca BP	14,5% p/p
Parafina líquida ligera PhEur	12,6% p/p
Agua	[al 100%]

Formulación B - lavado de cara (disponible comercialmente bajo la marca comercial "Clearasil")

[0078] Contenido del producto: Aqua, gluconato de sodio, propilenglicol, octildodecanol, Steareth-2, ciclopentasiloxano, Steareth-21, ácido salicílico, alcohol cetílico, alcohol behenílico, ciclohexasiloxano, poliacrilamida, isoparafina C13-14, goma xantana, fenoxietanol, silicato de magnesio y aluminio, laureth-7, mentol, metilparabeno, butilparabeno, etilparabeno, isobutilparabeno, propilparabeno, CI 77891.

Formulación C - gel (disponible comercialmente bajo la marca comercial "Dr Spot")

[0079] Contenido del producto: 2% de ácido salicílico, Witch Hazel, ácido láctico.

Resistencia al ácido salicílico

[0080] La formulación A fue suplementada con ácido salicílico en 0,5, 1,0, 1,5 y 2% p/p, etiquetada como formulaciones A1, A2, A3 y A4. La infectividad del fago en estas formulaciones se comparó con la infectividad del fago en la Formulación A (que no contenía ácido salicílico). Después de 2 semanas de almacenamiento, no se observó pérdida de infectividad en nada de A1-A4 en comparación con la Formulación A de control, lo que indica que no hay efectos adversos del ácido salicílico incluso al 2% sobre la supervivencia de los fagos.

Supervivencia de formulaciones que contienen fagos en el almacenamiento

[0081] Cada una de las formulaciones A, B y C se complementaron con bacteriófagos de *Propionibacterium acnes* covalentemente inmovilizados sobre partículas de nylon 12 y la infectividad del fago en comparación con el mismo título de fago libre (es decir, no inmovilizado) en las mismas formulaciones de base. Los resultados durante un período de 6 semanas se muestran en la Fig.1:
Por lo tanto, la supervivencia de los fagos mejoró significativamente mediante la inmovilización sobre las partículas de nylon en cada una de las Formulaciones A, B y C, en todos los casos en al menos un orden de magnitud y en 2 de 3 en varios órdenes de magnitud.

Ejemplo 2 - Formulación para uso tópico (*S. Aureus)*

Preparación de crema base:

[0082] 120 g de ungüento BP emulsionante se calentó a 60 grados C y se mezcló con agua 270 ml también calentado a la misma temperatura. La mezcla se agitó cuidadosamente mientras se enfriaba, produciendo una formulación cremosa blanca y suave. La crema se enfrió a temperatura ambiente y se dividió en 5 porciones iguales.

Producción de partícula de bacteriófago:

[0083] Partículas de Nylon 12 de diámetro medio de 3 micras se trataron por descarga de corona (75 campo kV) y rápidamente a una suspensión de bacteriófago en $1x10^9$ ufp/ml. Las partículas se lavaron 3 veces para eliminar los bacteriófagos no unidos. Usando este método, se hicieron 5 preparaciones de 2 ml separadas utilizando una de cada una de 5 cepas diferentes de bacteriófago específico para *S. aureus* del stock de fagos almacenado.

Formulación:

[0084] Para cada una de las 5 porciones separadas de base de crema se añadió una preparación de partícula de bacteriófago separada por mezcla y agitación hasta que la suspensión se había incorporado plenamente en la base. Después, las 5 bases separadas se combinaron y se mezclaron a fondo para formar una única base en crema que contenía 5 tipos de fagos inmovilizados diferentes.

Ejemplo 3 - Formulación para uso tópico *(P. acnes)*

[0085] Una formulación se preparó como sigue.

- Fase oleosa: ácido esteárico al 4%, alcohol estearílico al 5%, lanolina al 7%, miristato de isopropilo al 8%.
- Fase acuosa: metilcelulosa al 1%, en agua purificada.

[0086] Las dos fases se prepararon por separado en peso y se calentaron a 70ºC. Después, la fase acuosa se mezcló con la fase oleosa mediante trituración hasta que la crema se solidificó y enfrió.

[0087] Las partículas de Nylon 6,6 de diámetro medio de 10 micras fueron tratadas mediante el paso a través de una descarga en corona a 70 kV y se añadió rápidamente a una preparación de bacteriófago mixto que contiene 5 bacteriófagos diferentes contra *P acnes* en una concentración final de 1×10^9 ufp/ml. Las partículas se lavaron 3 veces para eliminar los bacteriófagos no unidos y se añadieron a la base de la crema para dar una concentración final de bacteriófagos de 1×10^5 ufp/ml.

Ejemplo 4 - Tratamiento de la infección sistémica

[0088] Cinco microesferas de diámetro de micra se prepararon por métodos de descarga de corona químicos o con la adición del bacteriófago unido purificado K. Una inyección por vía intravenosa (i.v.) de microesferas de 5 mm en suspensión en PBS fue dada a un grupo de ratas a una dosis de 20 mg/kg de peso corporal el día 7. No hubo cambios en el perfil de aumento de peso, lo que indicó que no hubo efectos adversos significativos de las microesferas o los bacteriófagos inmovilizados en los animales a corto plazo, como se muestra en la Figura 2.

[0089] Antes de la infección, un transpondedor de temperatura fue implantado en 2 ratas. La temperatura corporal se registró a intervalos de 30 minutos antes, durante y después de la fase de infección. Los animales se manipularon y

pesaron durante un período de 7 días durante el cual se acostumbraron al proceso de inmovilización mediante el cual se realizaba la toma de muestras de sangre. El experimento utilizó una dosis de 100 µl 1 x 10^8 ufc/ml de EMRSA 15 suspendida en mucina gástrica de cerdo al 5% utilizando la vía subcutánea (s.c.) como elección de administración en animales anestesiados. Las inyecciones se administraron a las 09:30 h, el primer momento de muestreo. Se llevó a cabo una inyección intravenosa en la cola de microesferas tratadas con bacteriófagos de 5 mm después de retirar la punta de la cola. Se calcularon los números de bacteriófagos en microesferas a partir de ensayos de placa que dieron un valor de 1,1 x 10^3 ufp/ml, 100 ul de inóculo contenían 10^2 ufp/ml.

[0090] La recuperación se supervisó continuamente con muestras de sangre cada hora durante 27 horas, luego a intervalos de 6 horas durante los siguientes 3 días. Los animales se sacrificaron 14 días después de la infección, durante los cuales se tomó una muestra de sangre final mediante punción cardíaca, se extrajeron los órganos, acompañada de frotis de sangre en placas y caldos para determinar la extensión de la infección. A medida que se introducían las microesferas, los órganos y la sangre también se analizarían para detectar la presencia de bacteriófagos.

Resultados

[0091] Los animales se recuperaron completamente después de una dosis s.c. de 100 µl 1 x 10^8 ufc/ml E15 y una inyección de cola i.v. de 5 µm de microesferas tratadas con bacteriófagos. Los animales no mostraron signos clínicos de malestar y continuaron en buen estado general de salud.

[0092] No fue un fuerte aumento de la temperatura que siguió poco después de inoculaciones que indican una respuesta de fiebre en el animal asociado con la infección - ver la Figura 3. Se mantuvo la temperatura a aproximadamente 38,5°C durante 24 horas después de la inoculación. Las microesferas unidas a bacteriófagos en esta etapa no tienen ningún efecto directo sobre la temperatura cuando se hace una comparación con inyecciones s.c. de bacterias solas.

[0093] Se realizaron recuentos bacterianos en muestras de sangre - ver Figura 4.

[0094] Se observó un patrón similar en ambos animales ya que el gráfico indica que con el tiempo, el número de bacterias aumentó, lo que significa la colonización y la afluencia de bacterias en el cuerpo del animal. Se observó una correlación entre la temperatura y el número de bacterias; un aumento de temperatura coincidió con un aumento de bacterias en la sangre.

[0095] Tubos de cultivo universales adicionales también se llenaron con caldo L para cultivar cualquier bacteria presente en la sangre. Los resultados reforzaron los recuentos bacterianos dando un resultado positivo para cada punto de tiempo. No se encontraron bacterias en los órganos después del sacrificio una semana después de la inoculación, lo que indica que la infección había dejado de ser sistémica.

[0096] Los resultados de muestreo de sangre demostraron una relación entre el aumento del número de bacterias con una temperatura elevada. Sin embargo, se demostró que la longevidad de esta temperatura elevada se ve afectada por el procedimiento de muestreo de sangre en sí. No se encontraron bacterias en la sangre en el momento del sacrificio, 1 semana después de la toma de muestras, lo que implicaba que se había eliminado la infección sistémica inicial.

[0097] Los recuentos bacterianos en órganos también dieron resultados negativos, lo que confirma la eliminación del modelo de infección sistémica - véase la Figura 5; esto contrastaba con los modelos en los que no se introdujeron bacteriófagos cuando se encontraron cantidades sustanciales de bacterias en el sacrificio.

[0098] El análisis de las placas producidas en la capa de agar usando un microscopio invertido no mostró la presencia de cuentas de nylon. Por tanto, se concluyó que los bacteriófagos aislados estaban libres y no la dosis inicial inmovilizada.

[0099] Se comparó recuento bacteriano entre los animales tratados y de control - ver la Figura 6.

[0100] Se midió el número de bacterias de más de 11 días - ver Figura 7. Los animales de prueba (C4-C10) mostraron un aumento inicial en el número de bacterias en los dos primeros dias; sin embargo, estas cifras disminuyeron rápidamente y se agotaron en los días siguientes. Esta tendencia fue similar en todos los animales, a diferencia de la tasa continua de crecimiento bacteriano observada en los animales de control.

[0101] Se midió el número de bacteriófagos en varios órganos - véase la Tabla 1. Los resultados mostraron que los números bacterianos fueron menores significativamente en todos los órganos que los de bacteriófagos. Un gran número de bacteriófagos libres debe resultar de una infección bacteriana dentro del cuerpo del animal. Su presencia en todos los órganos demostró la capacidad de las microesferas o bacteriófagos libres para viajar por todo el cuerpo.

Tabla 1.

	ufc/órgano		ufp/órgano	
Órgano/animal nº	9676	9677	9676	9677
Corazón	23	0	263	90
Pulmón	0	0	56	127
Bazo	47	22	141	60
Hígado	859	0	7	23
Riñón	18	0	6	52
(ufc = unidades formadoras de colonias de bacterias; ufp = unidades formadoras de placa de bacteriófagos)				

[0102] En los experimentos de este ejemplo, una dosis relativamente baja de bacteriófagos inmovilizados se utilizaron (100) en comparación con bacteriófagos "libres" utilizados en los experimentos descritos en la literatura (donde a menudo son 10^9 bacteriófagos utilizados). La infección modelo fue inducida por alrededor de 10^6 bacterias, de modo que las bacterias se multiplicaron antes de que el número de bacteriófagos aumentara a un nivel en donde las bacterias fueran eliminadas en gran medida. Es por eso que el número de bacterias continuó aumentando hasta 12 a 24 horas después de la inoculación. La cinética es compleja; las bacterias se multiplican logarítmicamente pero son fagocitadas por el sistema inmunológico, además de ser infectadas y destruidas por los bacteriófagos. Los bacteriófagos "libres" también serán eliminados por el sistema inmunológico (según la técnica anterior) y ahora se muestra que los bacteriófagos inmovilizados en microcuentas como se describe en el presente documento se eliminan del sistema circulatorio hacia el bazo y el hígado, donde permanecen activos (ver otros datos). y resultados aquí).

[0103] Los resultados mostraron que:

- microesferas de nylon en 5 mm de diámetro no causó efectos adversos obvios para el animal
- bacteriófagos inmovilizados en esta dosis no causa ningún efecto adverso medible.
- Bacteriófagos inmovilizados infectados *in vivo.*
- Las dosis bajas de bacteriófagos inmovilizados eliminaron las bacterias infecciosas del modelo.
- Los bacteriófagos libres resultantes de infecciones iniciales con bacteriófagos inmovilizados y los bacteriófagos inmovilizados que no causan una infección inicial permanecieron activos.
- Tanto las microcuentas tratadas con corona como las tratadas químicamente fueron igualmente activas.

Ejemplo 5 - Formulación que comprende los bacteriófagos y antibióticos

[0104] Hemos probado partículas de (1) ampicilina, (2) nylon 12 sobre las que bacteriófago K se unió covalentemente y (3) una formulación en donde ambos se administraron conjuntamente para la eficacia contra *S. aureus* 8588.

[0105] Fig. 8 muestra que el bacteriófago K no se vio afectado por la presencia de ampicilina en concentraciones cercanas a la CMI.

[0106] Los datos mostraron que la ampicilina fue capaz de matar la cepa 8588 de *S. aureus.* Se encontró que la CMI de ampicilina contra esta cepa de bacterias era de 0,02 mg/ml (20 mg/ml), lo que mostró que era una cepa resistente ("MRSA") (punto de corte de la CMI 0,125 mg/ml). Las lecturas de absorbancia de los tratamientos por encima de la CMI fueron similares a las del control negativo del caldo Mueller-Hinton solo, lo que indica que no hay crecimiento bacteriano.

[0107] La Figura 9 muestra que el fago K mató a las bacterias 8588 en cada concentración. Las lecturas de absorbancia de los pocillos tratados con fago K fueron similares a las del caldo Mueller-Hinton de control negativo solo.

[0108] Los datos en la Figura 10 no mostró ninguna interacción entre ampicilina a 0,01 mg/ml (por debajo de CMI) y bacteriófago lisis de *S. aureus* 8588. El valor de ampicilina (amp) es de un experimento análogo al que se muestra en la Figura 8. A 0,01 mg/ml de ampicilina (por debajo de la CMI), la ampicilina tiene algún efecto sobre el crecimiento bacteriano pero no es totalmente eficaz ya que sobreviven bacterias resistentes. La adición de fagos da como resultado la muerte total, lo que muestra que el fago destruye las bacterias resistentes que habrían sobrevivido a la dosis de antibiótico por debajo de la CMI. Esto demostró que las cepas bacterianas resistentes que emergen (y sobrevivirían si se trataran solo con antibióticos) pueden ser eliminadas por la terapia de combinación. Por tanto, la coadministración de antibiótico y fago inmovilizado fue eficaz para matar bacterias en este modelo.

Ejemplo 6 - Respuesta in vivo para adminstration del fago sobre partículas

[0109] Células P388.D1 (células de macrófagos de linfoides de ratón) se estimularon con (i) cuentas de nylon de5 micras, (ii) 100 microlitros de fago libre, (iii) cuentas de 5 micras con fagos unidos covalentemente y (iv) un control. Las muestras fueron periódicamente tomadas y los niveles de IL-1 alfa midieron utilizando ELISA - véase la Figura 11.

[0110] Un pequeño aumento en IL-1 alfa se observó después de 3 horas de estimulación pero ningún efecto después de la estimulación de 24 h. Estos resultados indicaron que el fago inmovilizado covalentemente no indujo una respuesta inmune en este modelo.

Ejemplo 7 - Supervivencia de bacteriófago inmovilizado en suero

[0111] Los estudios anteriores (Donlan RM (2006) Controlling clinically relevant biofilms using bacteriophage Biofilm Perspectives No. 2006: 02 www.BiofilmsOnline.com y Sokoloff A., Bock I., Zhang G.., Sebestyen M., y Wolff J. (2000) The interaction of peptides with the innate immune system studied with the use of T7 phage peptide display. Molecular Therapy 2, 131-139) ha demostrado que los fagos se inactivan después de 3 minutos de contacto con suero incubado a 37°C.

[0112] Se diseñó un experimento para dilucidar si bacteriófago unido covalentemente a las suturas mostró el mismo efecto.

[0113] Fago libre y fago en suturas se combinaron con suero ("normal" e inactivado por calor), se incubaron a 37°C y se probaron a intervalos regulares (ver resultados a continuación) para la retención de la actividad UFP.

Resultados

[0114] Con referencia a las Figuras 12 y 13, se encontró que después de 10 minutos en presencia de suero, el título de fagos del fago libre se redujo rápidamente a partir de entonces. Con suero tratado térmicamente (en donde se inactivó el complemento) no se produjo ninguna pérdida. Por separado, el fago inmovilizado fue resistente al suero (normal); el título del fago permaneció estable durante todo el experimento. Esto indicó que la actividad anti-bacteriófaga del suero no tratado tiene una base inmunológica.

Ejemplo 8

Análisis de la producción de anticuerpos IgM e IgG contra el fago inmovilizado

[0115] Se investigó la respuesta de anticuerpos en ratas de la administración de fago inmovilizado covalentemente sobre partículas de nylon de 5 micras. Se tomaron muestras de sangre mediante punción cardíaca y el suero de estas muestras se sometió a una prueba ELISA para determinar si se podía detectar alguna respuesta de anticuerpos.

Medición de IgG y IgM por ELISA

[0116] Se usó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para determinar si el suero sanguíneo contenía niveles de anticuerpos a bacteriófago 9563 en ratas experimentales.

[0117] El experimento se realizó por el método siguiente: se recogió sangre de las ratas en el sacrificio y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos y el suero resultante se recogió y se almacenó a -20°C. Se añadió tampón de recubrimiento de doble concentración reciente (100 µl) a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania) con bacteriófago purificado (100 µl) para inmovilizarlos en la microplaca. Se añadió PBS (100 µl) a los pocillos de control y la placa se dejó durante la noche a 4ºC o durante 2 horas a 37ºC. El líquido restante se extrajo y la placa se lavó a fondo 3 veces con PBS-Tween (Fisher Scientific, Leicestershire, Reino Unido). Las placas se golpearon repetidamente sobre toallas de papel hasta que no quedó líquido en los pocillos. Se añadió PBS-BSA (10 mg/ml) (200 µl) a cada pocillo durante 0,5 horas a 37ºC para bloquear los sitios de unión no específicos. Se vertió el líquido restante y se lavó la placa a fondo 3 veces con PBS-Tween antes de añadir 100 µl de suero y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en una caja sellada que contenía papel tisú húmedo para crear una atmósfera húmeda. Después de la incubación, se extrajo el líquido restante y se lavó la placa 3 veces con PBST-Tween.

[0118] Después del lavado, se añadieron 100 µl de una dilución 1 en 1000 de un segundo anticuerpo de HRP-ratón anti-IgM de rata o IgG (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, o a 37°C durante 30-40 min. Se extrajo el líquido restante y se lavó la placa 3 veces con PBS-Tween. Se añadió tetrametilbencidina (TMB) (150 µl) (Sigma, Aldrich, Reino Unido) en tampón de acetato citrato (5.2.1.) A cada pocillo y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 30-40 minutos en la oscuridad, hasta que la reacción la mezcla se volvió azul. La reacción se detuvo añadiendo H_2SO_4 4 M (50 ml) provocando que se tornara de color amarillo. La absorbancia se leyó a 450 nm usando un lector de placas (Labsystems iEMS Reader MF, Finlandia). Los resultados se compararon con muestras de sangre de control en las que las ratas no fueron expuestas al fago.

Resultados

[0119] Las tablas siguientes muestran los resultados por separado para IgM e IgG. En ambos casos, no hubo una diferencia estadísticamente significativa en la producción de anticuerpos; por lo tanto, el fago inmovilizado no estimuló la producción de anticuerpos anti-fagos en las ratas probadas.

Tabla 2 - Análisis estadístico de IgM + E15 solo frente a IgM E15 + cuentas y fagos

IgM	Grupo	IgM + E15 solo	IgM E15 + cuentas y fagos
	Media	0,37278200	0,26216200
	DE	0,23527212	0,24058500
	SEM	0,06074700	0,04811700
	N	15	25

Tabla 3 - Análisis estadístico de IgG + E15 solo frente a IgG E15 + cuentas y fagos

IgG	Grupo	IgG + E15 solo	IgG E15 + cuentas y fagos
	Media	0,37535700	0,31158300
	DE	0,18974907	0,16150500
	SEM	0,04899300	0,03230100
	N	15	25

[0120] Los resultados mostraron que los bacteriófagos inmovilizados eran poco inmunogénicos: no había respuesta inmune IgG ni IgM. Los experimentos subsiguientes repetidos por los inventores, utilizando fagos unidos covalentemente a cuentas de nylon, no han mostrado sistemáticamente ninguna respuesta de anticuerpos detectable al fago inmovilizado en modelos de rata.

Ejemplo 9 - Actividad de fagos después de la exposición *in vivo*

[0121] Las suturas a las que fago K se inmovilizaron covalentemente se prepararon y utilizaron como para el Ejemplo 6 en WO2012/175749. El día 14, se retiraron las suturas, se lavaron y se probó su actividad.

Resultados

[0122] Como se muestra en la Figura 14, las suturas eliminadas después de 2 semanas retienen la actividad de fagos tal como se mide por ensayo convencional de formación de placas. El fago inmovilizado no había sido inactivado por anticuerpos.

Ejemplo 10 - Retención in vivo de fagos inmovilizados

[0123] Se analizaron como en el ejemplo 4 muestras de hígado de ratas tratadas 14 días después de la administración de 5 micras de microesferas.

Resultados

[0124] Como se ve en la Figura 15, las microesferas (posteriormente confirmadas para llevar fago activo) fueron detectables (ver flechas) en el hígado de 14 días después de la administración sistémica.

Ejemplo 11 - Tratamiento de *P. acnes* en la piel humana

[0125] Con el fin de evaluar la eficacia de un bacteriófago inmovilizado sobre partículas en el tratamiento de la infección en la piel humana se llevó a cabo un estudio corto para determinar si la crema que contiene bacteriófagos reduciría la carga bacteriana sobre la piel.

[0126] La piel humana de un voluntario se limpió con alcohol y se inoculó con 1 x 10^4 ufc/ml de *P. acnes* (ATCC 6919). Esto se dejó secar al aire y luego se trató con:

1. crema E45,
2. crema E45 con 1 x 10^5 ufp/g de bacteriófago, o
3. crema E45 con 1 x 10^5 ufp/g de bacteriófagos inmovilizados en aproximadamente 10 micras de diámetro, cuentas de nylon 12.

[0127] En diferentes puntos de tiempo se tomaron hisopos para controlar la cantidad de bacterias en la piel.

[0128] Los resultados se muestran en la figura 16. Como se ve, en este estudio bacteriófagos inmovilizados en una base de crema eran más eficaces que los fagos libres y también más eficaces que el otro control (crema solo).

Ejemplo 12 - La piel de cerdo como modelo para infecciones de la piel

[0129] Se desarrolló el protocolo siguiente para el uso de piel de cerdo como modelo para infecciones de la piel humana y tratamiento de la misma de acuerdo con la invención.

Inmovilización de bacteriófagos

[0130] Los bacteriófagos previamente aislados se inmovilizan sobre cuentas de nylon que pueden incorporarse a productos de tratamiento del acné; utilizar cuentas de nylon de 10 micras, grado cosmético, como se describió previamente en un trabajo publicado anteriormente por el solicitante, por ejemplo, en el documento WO 2007/072049.

Sistema de protocolos

[0131] Las cuentas de nylon actúan como un sistema modelo para la inmovilización del bacteriófago a nanopartículas que van a ser incorporadas en los tratamientos del acné y cremas.

[0132] Cada material tratado se prueba para la inhibición del crecimiento bacteriano. Los efectos se comparan con el material expuesto a bacteriófagos no inmovilizados y al material solo. Los experimentos incorporan múltiples pruebas y pruebas continuas hasta que ya no se observa el efecto inhibidor.

[0133] Tras la finalización, la eficacia de un bacteriófago inmovilizado para controlar crecimiento *bacteriano* y la vida útil de un bacteriófago inmovilizado se determinan en cada material.

Tratamiento de la infección de la piel utilizando bacteriófagos inmovilizados

[0134] La piel de cerdo se prepara e inocula como sigue.

[0135] La piel de cerdo fresca se maneja de forma aséptica. La piel se limpia con alcohol al 70% para eliminar las bacterias contaminantes.

[0136] Una vez seca la piel está contaminada con la cepa bacteriana destinada a una concentración de 1×10^4 ufc/cm^2. Con un hisopo estéril, la solución bacteriana se unta en la piel y se deja secar al aire en la campana de flujo laminar durante 15 minutos. Se aplica el tratamiento con bacteriófago deseado, utilizando las cuentas sobre las que se han inmovilizado los bacteriófagos como se describió anteriormente, y luego se incuba la piel a 37°C durante 16 horas.

[0137] La piel de cerdo se somete a ensayo para bacterias contaminantes en medios selectivos. Los recuentos bacterianos se realizan después de la inoculación para determinar si el tratamiento fue exitoso.

Ejemplo 13 - Eficacia del tratamiento del acné en la piel porcina modelo

[0138] El modelo de piel de cerdo descrito anteriormente se utiliza para demostrar la eficacia de la administración de bacteriófago inmovilizado para tratar el acné.

[0139] La bacteria huésped usada para inocular la piel de cerdo fue *Staphylococcus aureus* 8588 y el bacteriófago utilizado para infectar esta bacteria eran los fagos K.

[0140] Los fagos K se inmovilizaron sobre cuentas de nylon de diámetro de 10 micras; se inmovilizaron 1×10^7 ufp/ml de bacteriófago sobre 1 g de cuentas de 10 micras.

[0141] La piel de cerdo se inoculó con *S. aureus* como se describe arriba. La piel de cerdo (4 cm x 4 cm) se trató con crema base E45 (1 ml) y aproximadamente 1×10^4 cuentas de ufp, también como se describió anteriormente.

[0142] Los resultados de este ensayo se exponen en la Tabla 4 y muestran que el número de bacterias en las muestras de prueba de la piel se redujo con éxito mediante la aplicación de la crema que contiene bacteriófagos inmovilizados.

Tabla 4

Nº Ensayo	Número de bacterias (ufc)		
	Control	Libre	Inmovilizado
1	120000	150000	60000
2	280000	170000	30000
3	220000	180000	20000
Media	206667	166667	36667

[0143] La invención así proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de:

(1) acné;
(2) impétigo, por ejemplo causado por *S. aureus* y/o *S. pyogenes;*
(3) foliculitis, furunculosis o carbunculosis, por ejemplo causadas por *S. aureus* o *Pseudomonas aeruginosa;*
(4) ectima, por ejemplo causada por *S. aureus* o *S. pyogenes;* o
(5) la erisipela o celulitis, por ejemplo, causadas por el grupo A estreptococo β-hemolítico (erisipela), *S. aureus* (celulitis) o *S. pyogenes.*

[0144] La invención proporciona además una formulación tópica, que comprende un bacteriófago unido covalentemente a una partícula de portador y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento del acné.

[0145] La invención también proporciona el uso de una formulación tópica, que comprende un bacteriófago unido covalentemente a una partícula de soporte y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento del olor corporal.

REIVINDICACIONES

1. Bacteriófago unido covalentemente a una partícula portadora, para uso en el tratamiento tópico de infecciones bacterianas seleccionadas entre:

(1) acné;
(2) impétigo, por ejemplo causado por *S. aureus* y/o *S. pyogenes;*
(3) foliculitis, furunculosis o carbunculosis, por ejemplo causadas por *S. aureus* o *Pseudomonas aeruginosa;*
(4) ectima, por ejemplo causada por *S. aureus* o *S. pyogenes;* o
(5) la erisipela o celulitis, por ejemplo, causadas por el grupo A estreptococo β-hemolítico (erisipela), *S. aureus* (celulitis) o *S. pyogenes.*

2. Bacteriófago para su uso según la reivindicación 1, en donde la partícula portadora es aproximadamente esférica y tiene un diámetro medio de hasta 20 micras.

3. Bacteriófago para uso en el tratamiento tópico del acné según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, exento de ácido salicílico y exento de peróxido de benzoilo.

4. Una pluralidad de bacteriófagos activos contra 3 o más cepas de bacterias, unidos covalentemente a partículas portadoras, para su uso según cualquier reivindicación anterior.

5. Una formulación tópica, que comprende bacteriófago unido covalentemente a una partícula portadora y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento del acné.

6. Uso de una formulación tópica, que comprende bacteriófagos unidos covalentemente a una partícula portadora y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento del olor corporal.

7. La formulación tópica para uso según la reivindicación 5 o el uso según la reivindicación 6, en forma de gel, crema o loción.

8. La formulación tópica para uso según la reivindicación 7 o el uso según la reivindicación 7, que comprende uno o más o todos de:

un agente formador de gel,
un agente formador de crema,
una cera,
un aceite,
un tensioactivo y
un aglutinante.

9. La formulación tópica para uso de acuerdo con las reivindicaciones 5, 7 y 8 o el uso de acuerdo con las reivindicaciones 6-8, comprendiendo dicha formulación tópica partículas de diámetro medio de hasta 20 micras.

10. La formulación tópica para uso según las reivindicaciones 5 y 7-9 o el uso según las reivindicaciones 6-9, donde dicha formulación tópica está en forma de gel, crema o loción, que comprende partículas de diámetro medio de hasta 10 micras.

11. La crema o gel para uso de acuerdo con las reivindicaciones 7-10 o de su uso de acuerdo con las reivindicaciones 7-10, comprendiendo dicha crema o gel bacteriófagos líticos para *P. acnes* unidos covalentemente a partículas portadoras de un diámetro medio de hasta 20 micras.

12. La crema o gel para el uso según la reivindicación 11 o su uso según las reivindicaciones 11, dicho crema o gel que comprende bacteriófagos líticos durante al menos 3 cepas diferentes de *P. acnes* unidos covalentemente a las partículas portadoras.

13. La crema o gel para el uso según las reivindicaciones 7 y 8 o su uso según las reivindicaciones 7 y 8, comprendiendo dicha crema o gel bacteriófagos líticos para *S. aureus* unido covalentemente a partículas portadoras de un diámetro medio de hasta 20 micras.

14. La crema o gel para usar según la reivindicación 13 o su uso según la reivindicación 13, comprendiendo dicha crema o gel bacteriófagos líticos para al menos 3 cepas diferentes de *S. aureus* unido covalentemente a la partícula portadora.

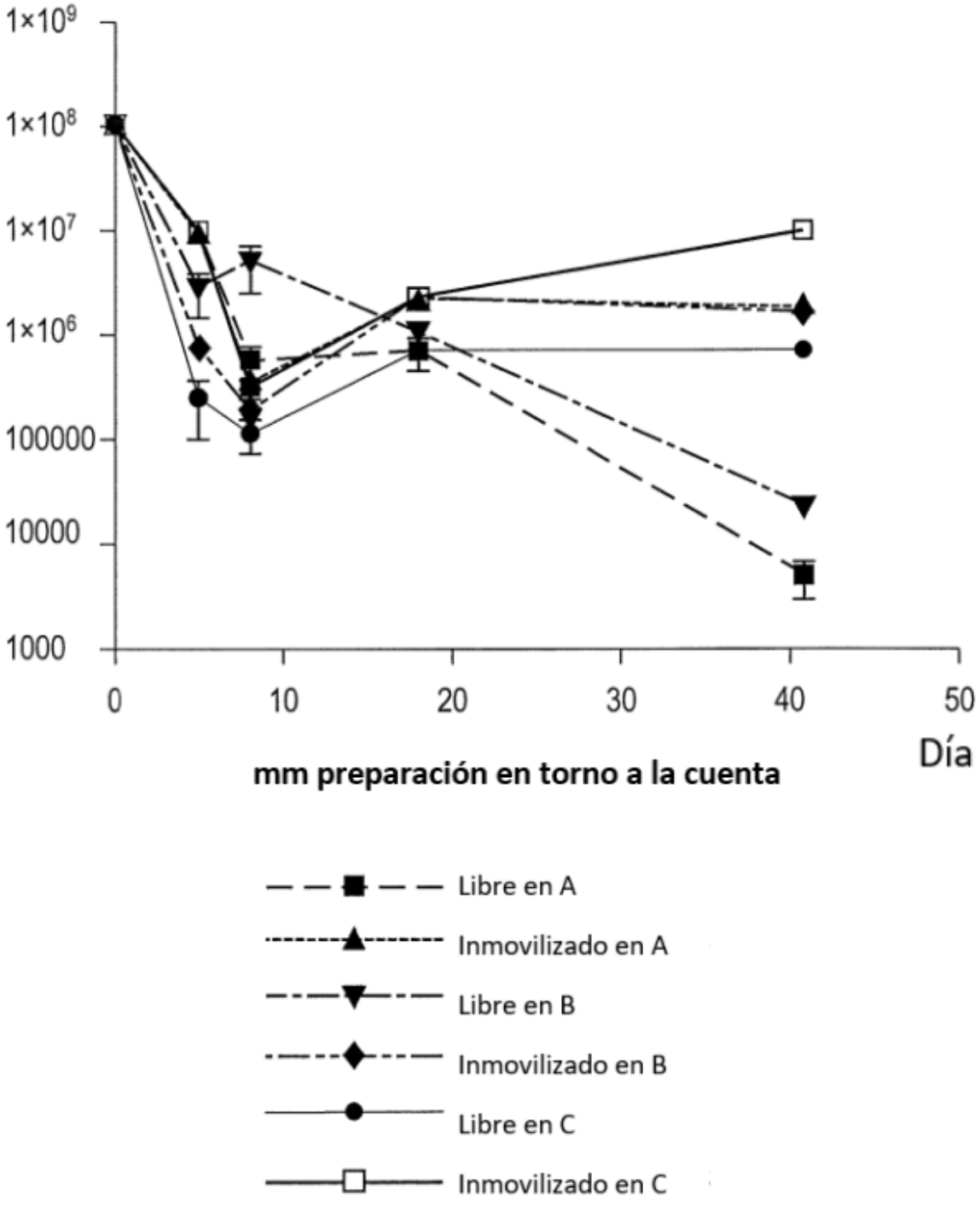
1×10⁹
1×10⁸
1×10⁷
1×10⁶
100000
10000
1000
0
10
20
30
40
50
Día
mm preparación en torno a la cuenta
Libre en A
Inmovilizado en A
Libre en B
Inmovilizado en B
Libre en C
Inmovilizado en C

Fig.1

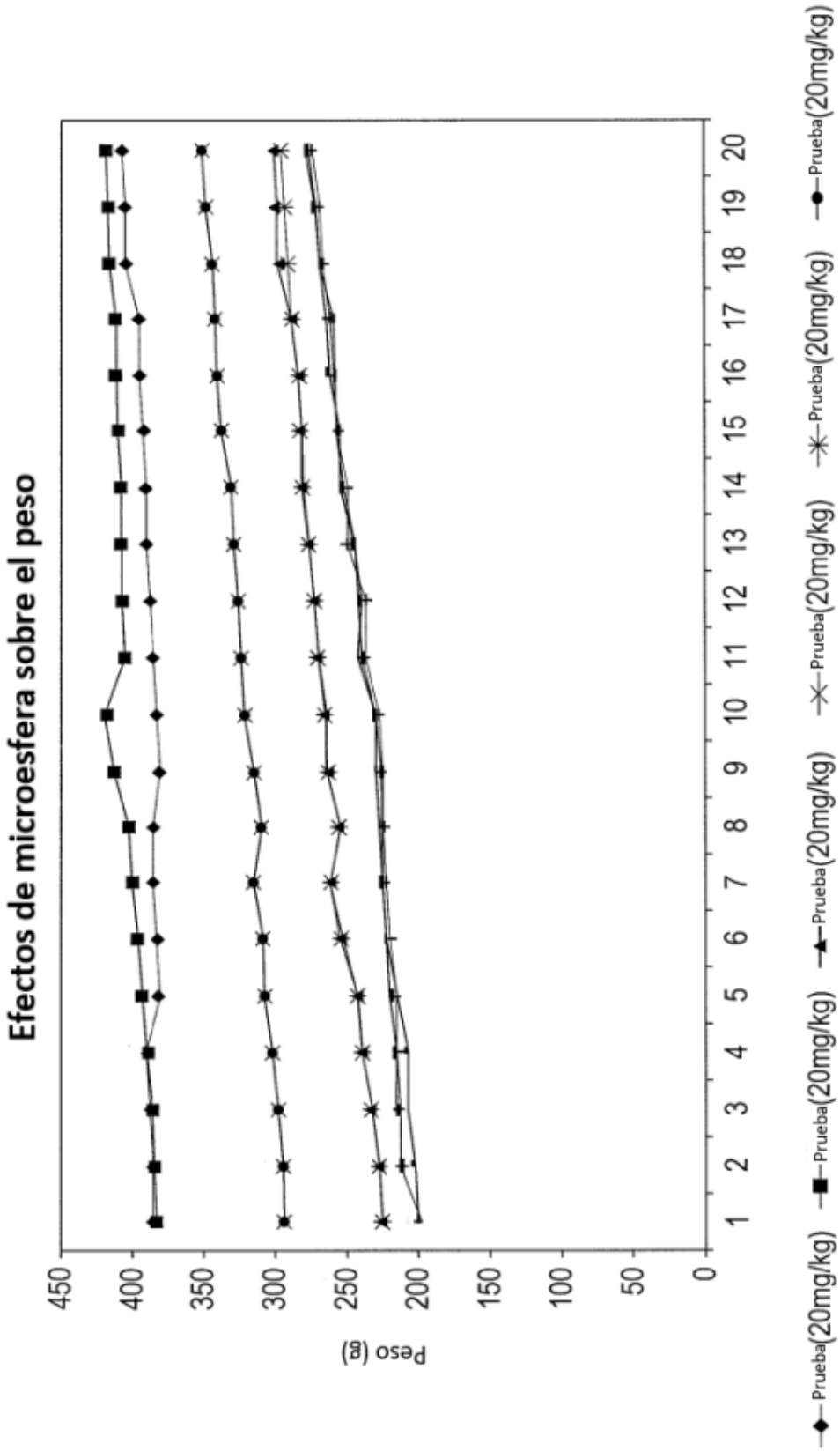
Efectos de microesfera sobre el peso
Peso (g)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Prueba(20mg/kg)
Prueba(20mg/kg)
Prueba(20mg/kg)
Prueba(20mg/kg)
Prueba(20mg/kg)
Control
Control
Control

Fig.2

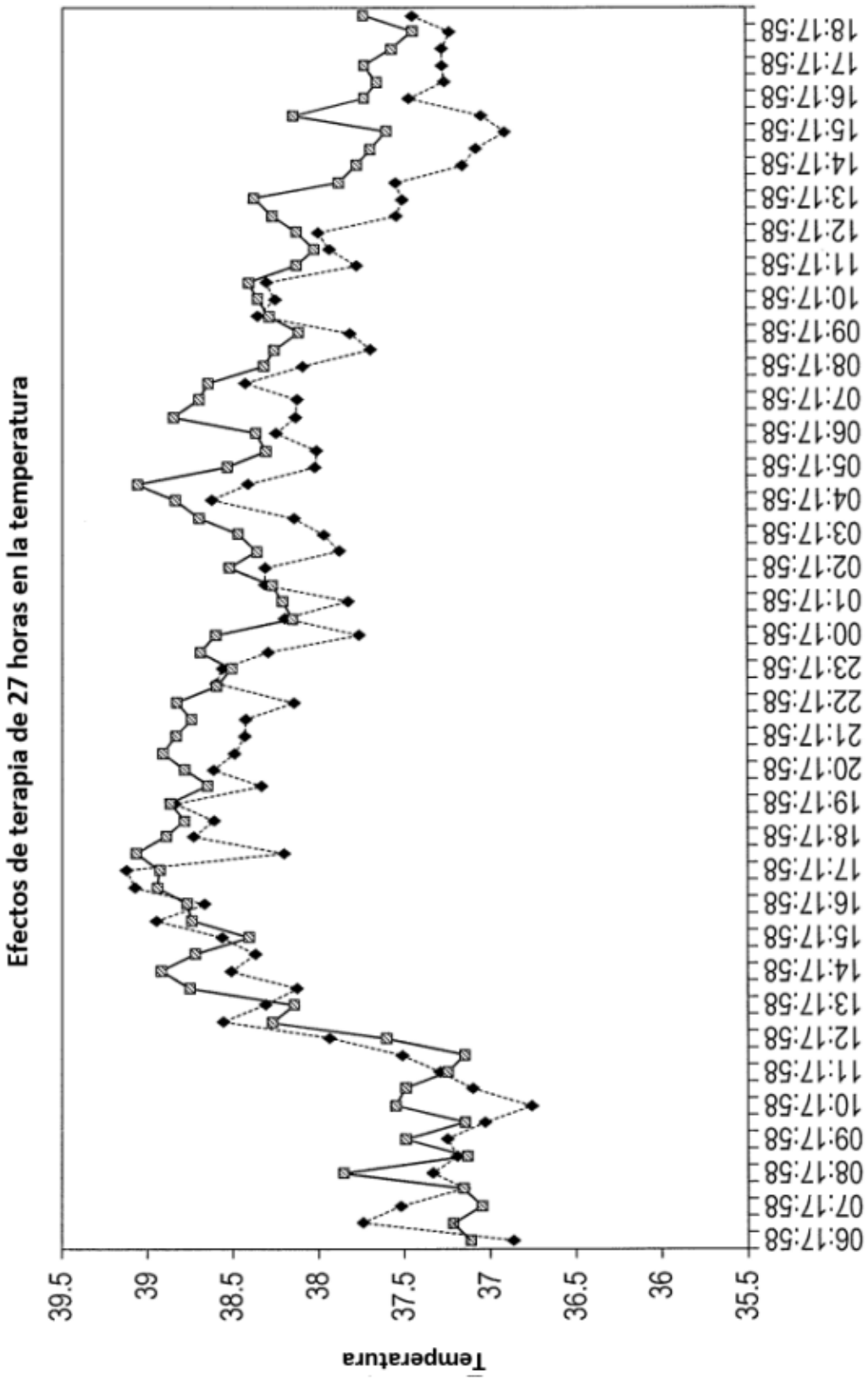
Efectos de terapia de 27 horas en la temperatura
Temperatura
39.5
39
38.5
38
37.5
37
36.5
36
35.5
06:17:58
07:17:58
08:17:58
09:17:58
10:17:58
11:17:58
12:17:58
13:17:58
14:17:58
15:17:58
16:17:58
17:17:58
18:17:58
19:17:58
20:17:58
21:17:58
22:17:58
23:17:58
00:17:58
01:17:58
02:17:58
03:17:58
04:17:58
05:17:58
06:17:58
07:17:58
08:17:58
09:17:58
10:17:58
11:17:58
12:17:58
13:17:58
14:17:58
15:17:58
16:17:58
17:17:58
18:17:58
9676
9677

Fig.3

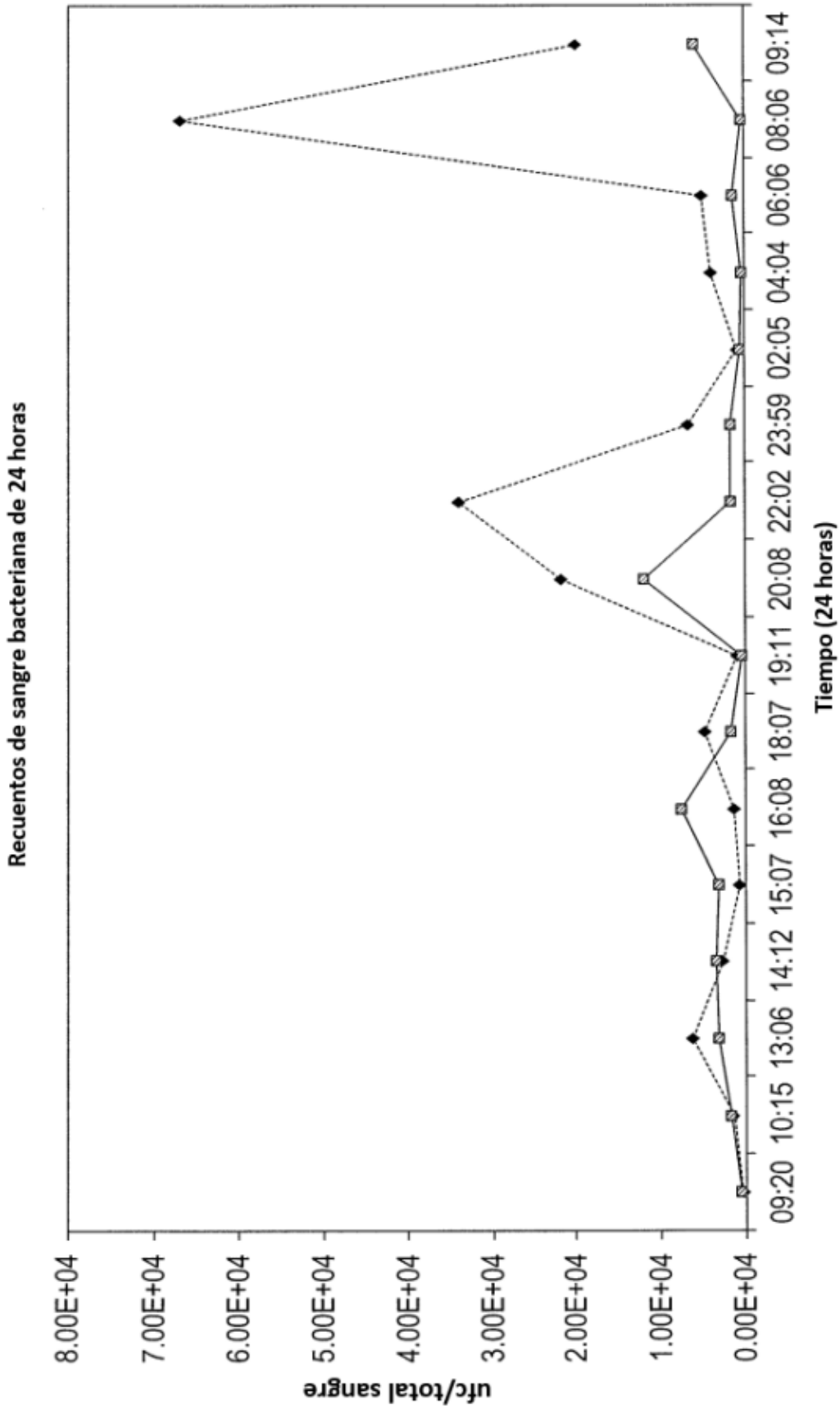
Recuentos de sangre bacteriana de 24 horas
ufc/total sangre
8.00E+04
7.00E+04
6.00E+04
5.00E+04
4.00E+04
3.00E+04
2.00E+04
1.00E+04
0.00E+04
09:20
10:15
13:06
14:12
15:07
16:08
18:07
19:11
20:08
22:02
23:59
02:05
04:04
06:06
08:06
09:14
Tiempo (24 horas)
9674
9675

Fig.4

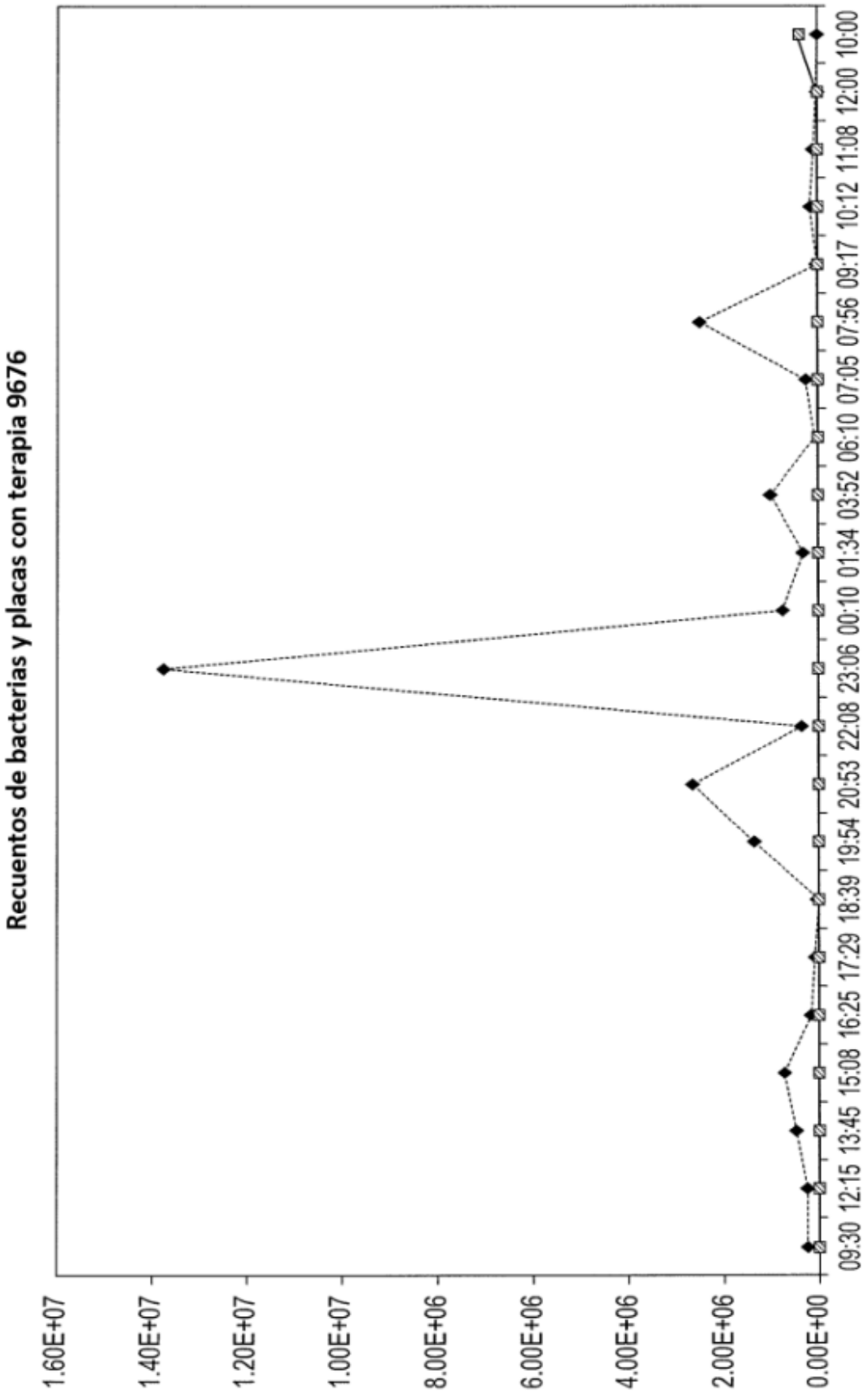
Recuentos de bacterias y placas con terapia 9676
1.60E+07
1.40E+07
1.20E+07
1.00E+07
8.00E+06
6.00E+06
4.00E+06
2.00E+06
0.00E+00
09:30 12:15 13:45 15:08 16:25 17:29 18:39 19:54 20:53 22:08 23:06 00:10 01:34 03:52 06:10 07:05 07:56 09:17 10:12 11:08 12:00 10:00
(ufc/total sangre
pfu/total sangre

Fig.5

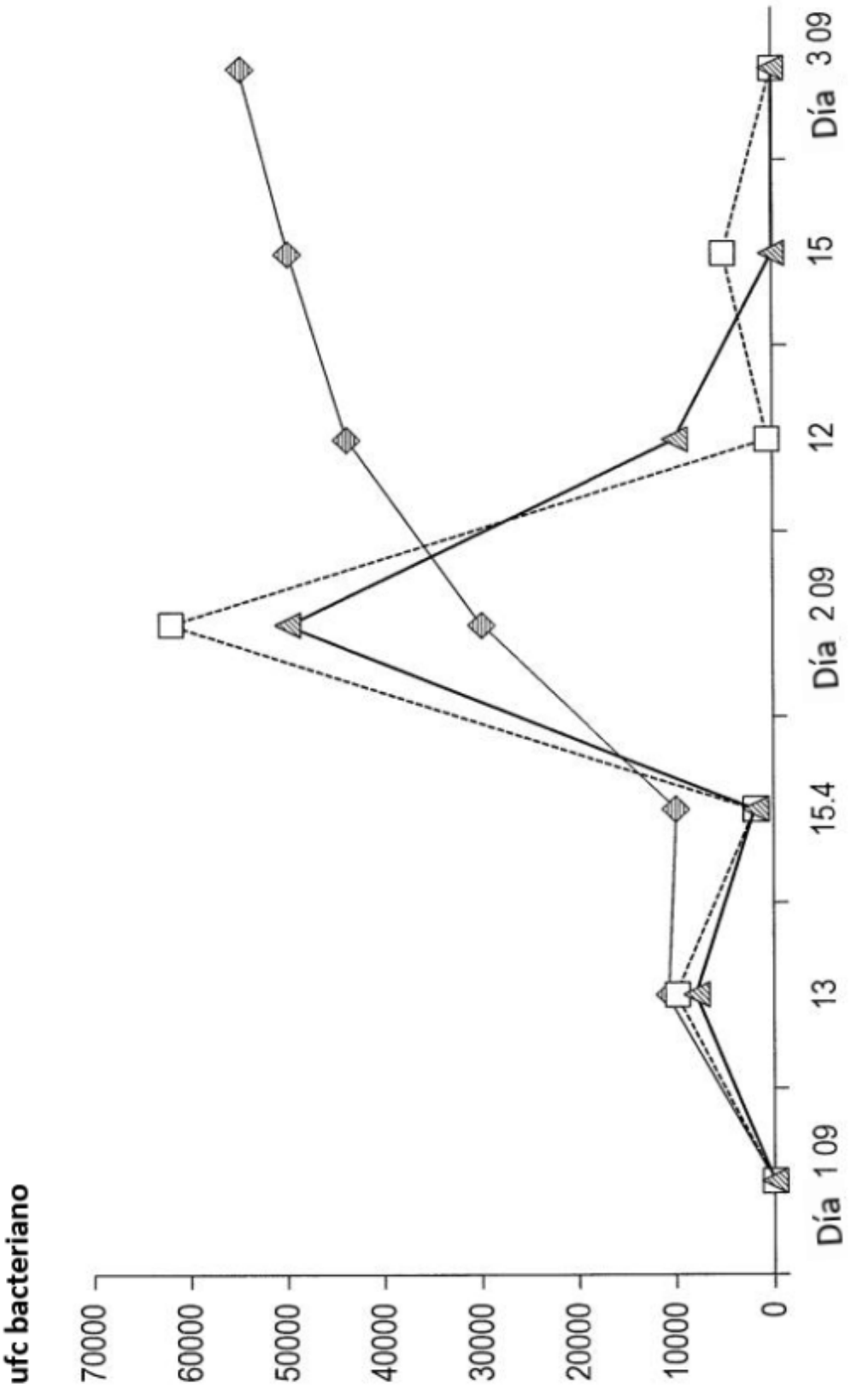
ufc bacteriano
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Día 1 09
13
15.4
Día 2 09
12
15
Día 3 09

Fig.6

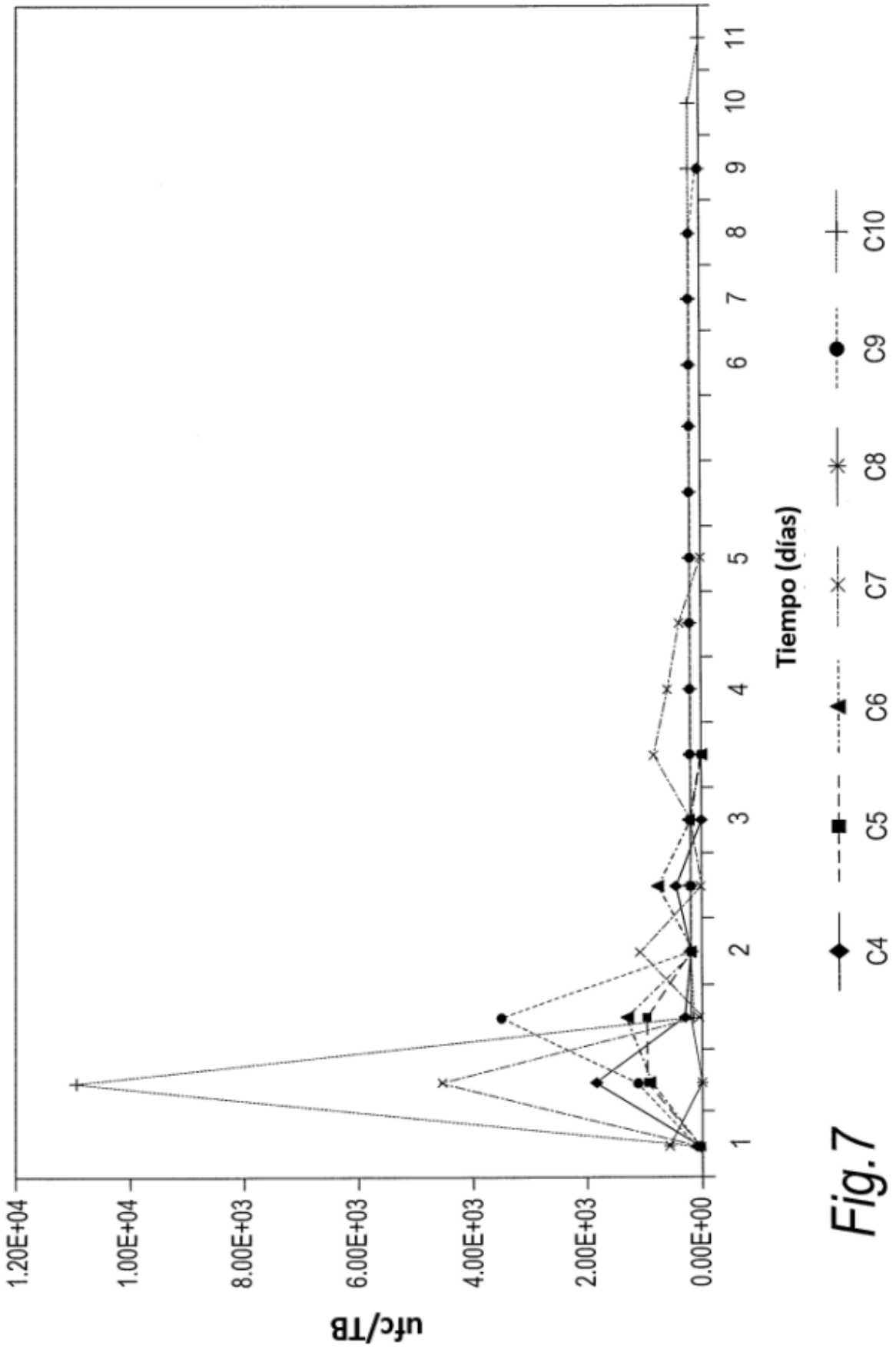
ufc/TB
1.20E+04
1.00E+04
8.00E+03
6.00E+03
4.00E+03
2.00E+03
0.00E+00
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
Tiempo (días)
C4
C5
C6
C7
C8
C9
C10

Fig.7

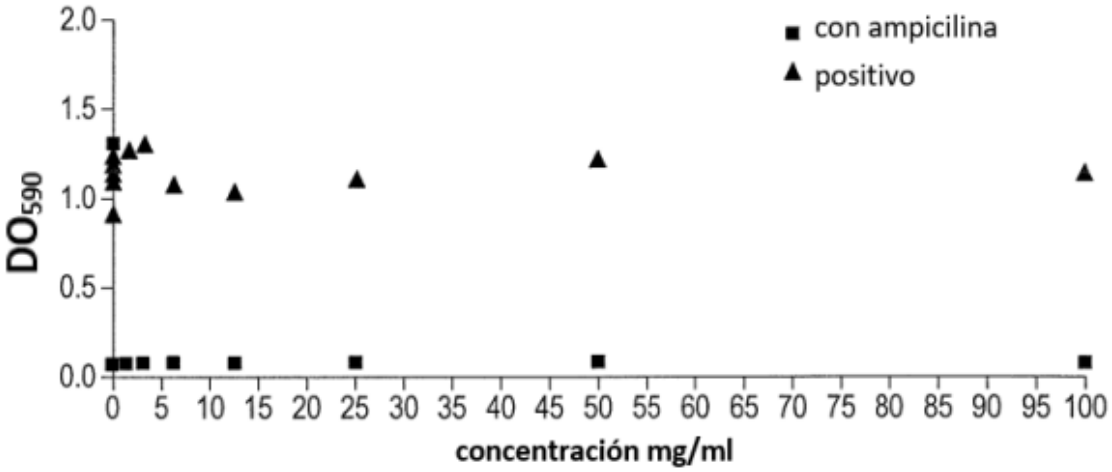
con ampicilina
positivo
DO590
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100
concentración mg/ml

Fig.8

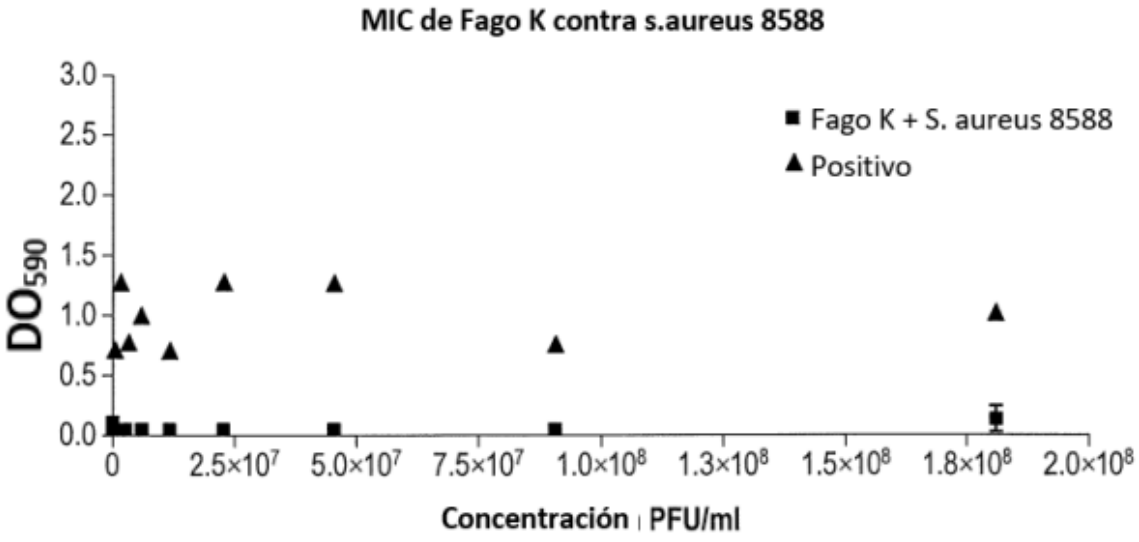
MIC de Fago K contra s.aureus 8588
Fago K + S. aureus 8588
Positivo
DO590
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0 2.5×10^7 5.0×10^7 7.5×10^7 1.0×10^8 1.3×10^8 1.5×10^8 1.8×10^8 2.0×10^8
Concentración PFU/ml

Fig.9

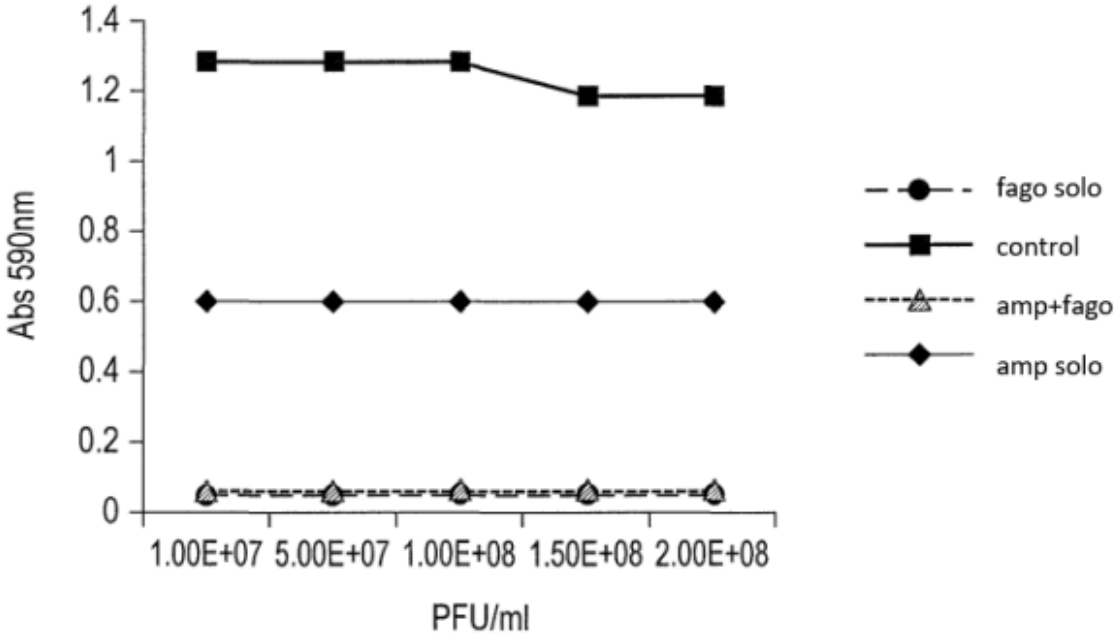
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Abs 590nm
1.00E+07
5.00E+07
1.00E+08
1.50E+08
2.00E+08
PFU/ml
fago solo
control
amp+fago
amp solo

Fig.10

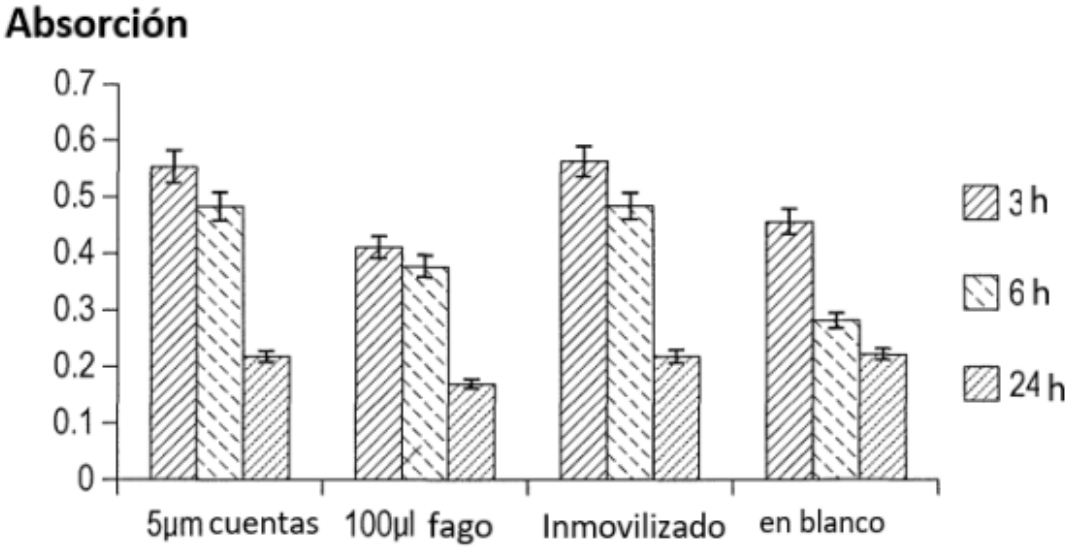
Absorción
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
5µm cuentas
100µl fago
Inmovilizado
en blanco
3 h
6 h
24 h

Fig.11

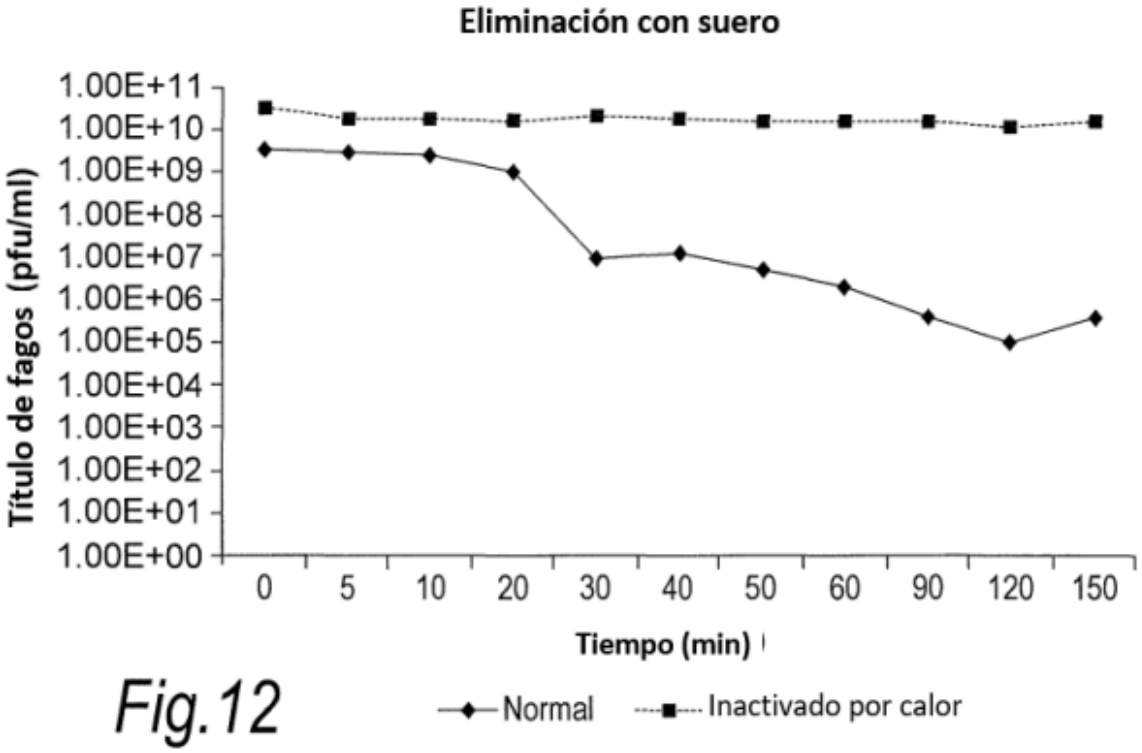
Eliminación con suero
Título de fagos (pfu/ml)
1.00E+11
1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
1.00E+01
1.00E+00
0
5
10
20
30
40
50
60
90
120
150
Tiempo (min)
Normal
Inactivado por calor

Fig.12

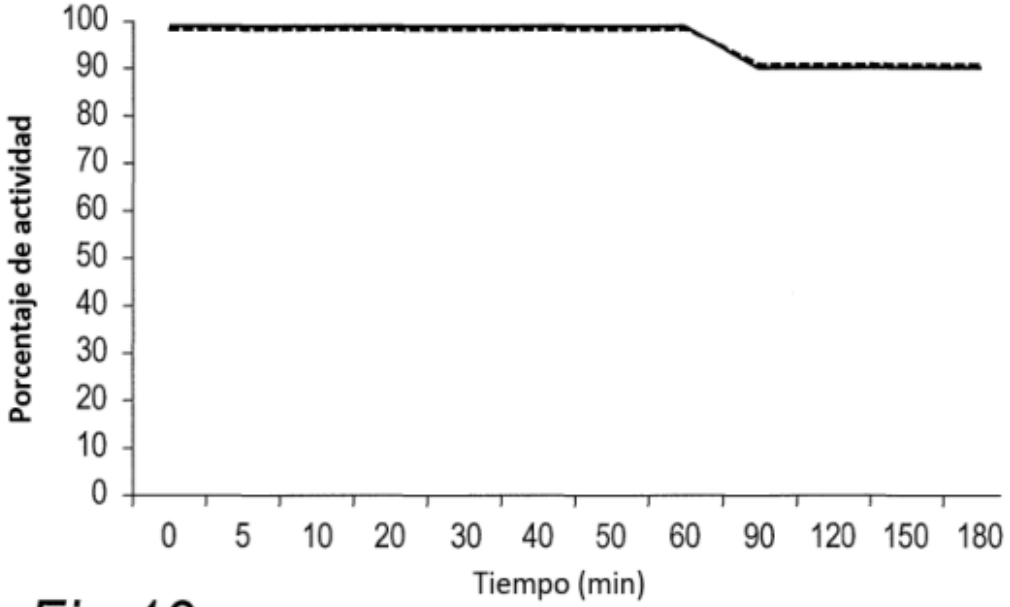
Porcentaje de actividad
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
20
30
40
50
60
90
120
150
180
Tiempo (min)

Fig.13

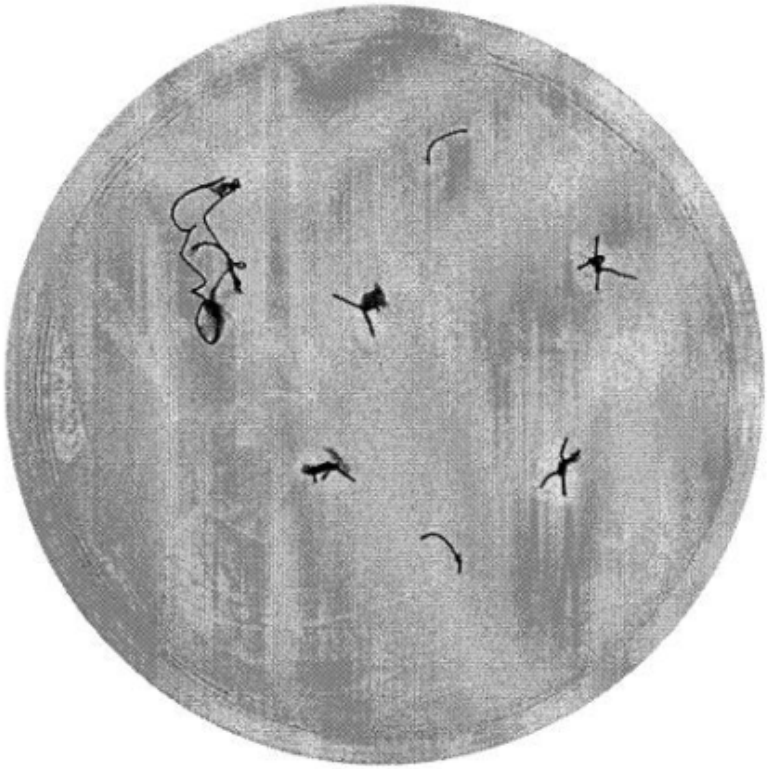

Fig.14

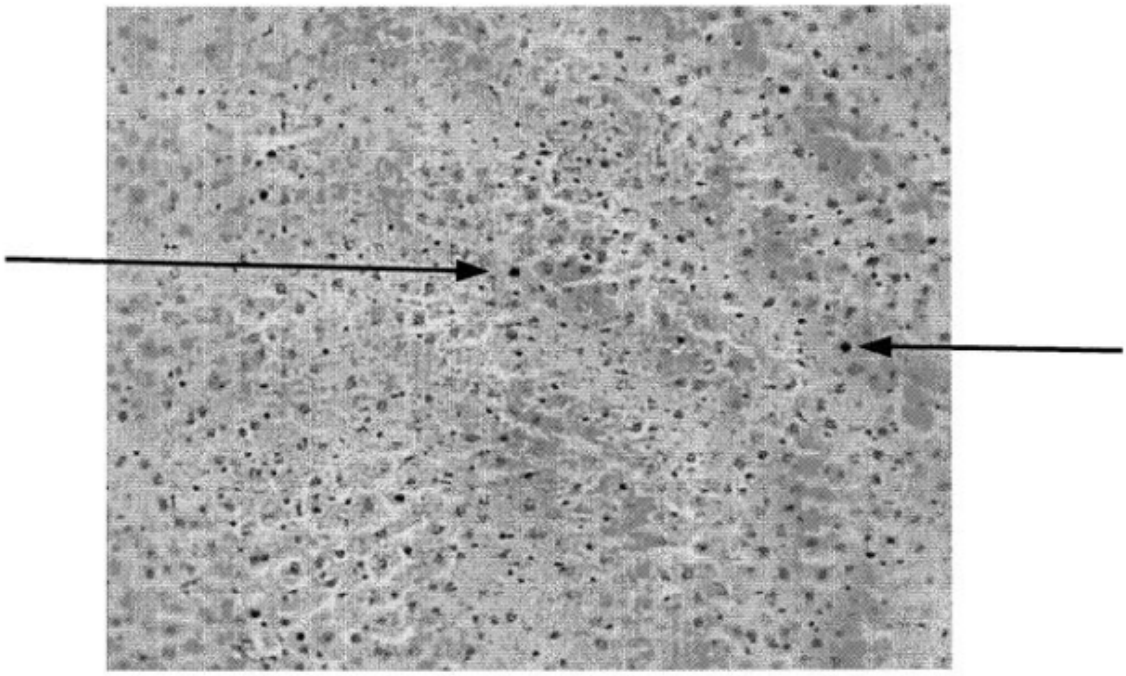

Fig.15

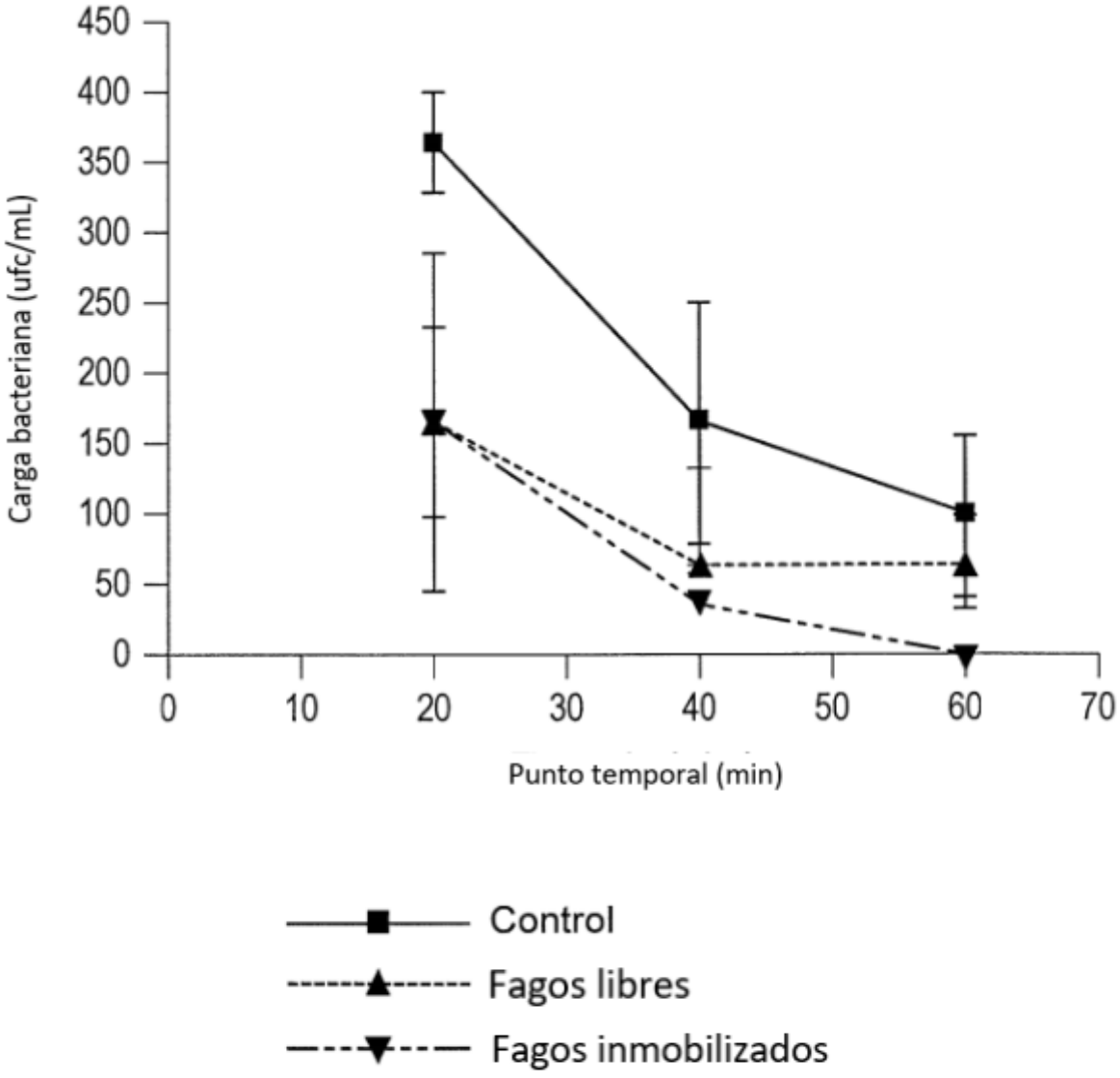
Carga bacteriana (ufc/mL)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Punto temporal (min)
Control
Fagos libres
Fagos inmobilizados

Fig.16